THESIS Amsterdam 1955

# ZONE-ELECTROPHORESE BIJ COLLAGEENZIEKTEN

ONDERZOEKINGEN OVER DE EIWITTEN VAN SERUM EN GEWRICHTSVLOEISTOF

DOOR A. ALPIT

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

# ZONE-ELECTROPHORESE BIJ COLLAGEENZIEKTEN

## ONDERZOEKINGEN OVER DE EIWITTEN VAN SERUM EN GEWRICHTSVLOEISTOF

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/zoneelectrophore0000unse_z9h9

# ZONE-ELECTROPHORESE BIJ COLLAGEENZIEKTEN

ONDERZOEKINGEN OVER DE EIWITTEN VAN SERUM EN GEWRICHTSVLOEISTOF

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM,

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS, DR. M. W. WOERDEMAN,

HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE,

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN

DE AULA DER UNIVERSITEIT OP DONDERDAG 26 MEI 1955

DES NAMIDDAGS TE 5 UUR DOOR

ARNOLDUS ADRIAAN PIT

GEBOREN TE BUSSUM

DE BEZIGE BIJ AMSTERDAM

MDCCCCLV

PROMOTOR PROF. DR. P. FORMIJNE

## VOORWOORD

Dit onderzoek werd verricht in het Laboratorium van de Algemene Pathologie van de Universiteit van Amsterdam onder leiding van Prof. Dr. P. Formijne. Voor de hulp bij de bewerking van dit proefschrift ben ik mijn Hooggeschatte Promotor zeer erkentelijk.
Dat Professor Formijne mij aan zijn staf heeft willen verbinden voor bestudering van vraagstukken op het gebied van de rheumatologie, beschouw ik als een bijzonder voorrecht.
Vanaf 1951 werd mij door Professor Formijne, na volbrenging van mijn interne opleiding, de gelegenheid geboden een methode van eiwitonderzoek door middel van papierelectrophorese te bestuderen.
Tijdens het assistentschap in de Leidse Rheumatologische Kliniek, onder leiding van Prof. Dr. J. Goslings, waren de omstandigheden zeer gunstig de eiwitveranderingen in het bijzonder bij de rheumatische ziekten te onderzoeken. Voor de actieve medewerking van Professor Goslings wil ik mijn bijzondere dankbaarheid betuigen. De meeste patienten, die door mij werden geobserveerd voor dit onderzoek, zijn afkomstig uit zijn kliniek. Mej. H. Floberg assisteerde mij – ook nog geruime tijd na mijn vertrek als consulent in de kliniek van Prof. Dr. M. A. van Bouwdijk Bastiaanse – bij de uitvoering van het qualitatieve electrophorese-onderzoek.
Voor de uitvoering van dit onderzoek werd tevens technische hulp verleend door Mej. J. van Zwet. Administratieve hulp werd geboden door Mej. P. de Vlaming. Allen, die bij het tot stand komen van dit proefschrift hun medewerking hebben verleend, wil ik mijn oprechte dank betuigen.

AAN MIJN VROUW

# INHOUD

## I T/M IV ALGEMEEN GEDEELTE EN METHODIEK


I *a* Inleiding tot de electrophorese . . . . . 11
*b* Electrophorese in een capillair systeem . . . . . 12
*c* Electrophorese en electro-osmose . . . . . 13
*d* Beschrijving van de methodiek . . . . . 15
*e* Qualitatief en quantitatief onderzoek van de serumeiwit-fracties . . 17
*f* Eigen onderzoek van de amidozwart kleurstofbinding aan zuivere serumeiwit-fracties . . . . . 22
*g* Eigen onderzoek van de gemiddelde relatieve waarden bij 50 normale personen. Standaard-deviaties. Boven- en ondergrenzen van normaal 25
*h* Vergelijking met gemiddelde relatieve waarden van andere onderzoekers . . . . . 26
*i* Vergelijking met de standaard-deviaties van andere onderzoekers . . 27
*j* Eigen onderzoek naar de reproduceerbaarheid en foutengrenzen van de methode . . . . . 28

II *a* Eigen onderzoek ter vergelijking van de klassieke uitzoutingsmethode volgens Howe met de zone-electrophorese . . . . . 33
*b* Vergelijking van de Tiselius'-electrophorese met de zone-electrophorese (8 eigen bepalingen) . . . . . 36

III *a* Algemene beschouwing over de electrophoretische eiwit-fracties van het bloed . . . . . 43
*b* De productie en herkomst van antilichaam-eiwitten . . . . . 47
*c* De invloed van *A.C.T.H.* en cortison op de productie van antilichamen 49

IV *a* Kort overzicht van de electrophoretische serumeiwit-fracties bij verschillende interne ziekten en dierexperimenten . . . . . 55
I Acute ziekteprocessen van infectieuze aetiologie. . . . . 55
II Chronisch infectieuze processen. Tuberculose . . . . . 55
III Leverziekten: hepatitis, cirrhose, acute gele lever-atrophie . . . 56
IV Nierziekten: genuine lipoid nephrose en nephritis . . . . . 57
V Endocrine ziekten . . . . . 58
VI Bloedziekten en reticulosen . . . . . 58
VII Ziekte van Kahler. Kala Azar . . . . . 58
VIII Neoplasmata. . . . . 59
IX Ondervoeding . . . . . 59
X Dierexperimenten. Aspecificiteit van de veranderingen . . . . . 59
*b* Eigen onderzoek van sera van patienten lijdende aan de ziektebeelden sub I tot en met sub VIII . . . . . 60

V *a* Algemene inleiding ter bepaling van de begrippen rheuma, rheumatische ziekten, collageenziekten en pararheumatische aandoeningen . 65
*b* Literatuur-overzicht van de bloedeiwit-veranderingen bij rheumatoide arthritis . . . . . 66
*c* Eigen onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij rheumatoide arthritis . . . . . 67
*d* Vergelijking met de resultaten van andere onderzoekers . . . . . 76

VI *a* Eigen onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij de ziekte van Bechterew . . . . . 81
*b* Vergelijking met de resultaten van andere onderzoekers . . . . . 84
*c* De bloedeiwit-veranderingen bij febris rheumatica. Literatuuroverzicht. 84

VII *a* Algemene beschouwing over de collageenziekten lupus erythematodes disseminatus, poly-arteriitis nodosa, sclerodermie en dermato-myositis. Histologische veranderingen . . . . . 89
*b* Lupus erythematodes disseminatus. Methoden van onderzoek naar *L.E.* cellen. . . . . 92
Eigen onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij lupus erythematodes disseminatus . . . . . 97
Vergelijking met de resultaten van andere onderzoekers . . . . . 98
*c* De serumeiwit-veranderingen bij peri-arteriitis nodosa, diffuse sclerodermie en dermato-myositis . . . . . 102

VIII Eigen onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij enkele andere gewrichtsziekten. . . . . 107

IX De veranderingen van de bloedeiwit-fracties door behandeling met adreno corticotroop hormoon en cortison . . . . . 111
*a* Literatuuroverzicht . . . . . 113
*b* Eigen onderzoek van de veranderingen van de serumeiwitten onder invloed van de behandeling met *A.C.T.H.* bij lijders aan rheumatoide arthritis en ziekte van Bechterew . . . . . 115

X Electrophoretisch onderzoek van gewrichtsvloeistoffen bij rheumatische ziekten . . . . . 123
*a* Literatuuroverzicht . . . . . 125
*b* Eigen onderzoek . . . . . 128
*c* De invloed van intra articulaire toediening van hydrocortison op de eiwit-fracties van de synovia-vloeistof . . . . . 131

Samenvatting. Summary. Literatuurlijst . . . . . 135

# I

*a* INLEIDING TOT DE ELECTROPHORESE

*b* ELECTROPHORESE IN EEN CAPILLAIR SYSTEEM

*c* ELECTROPHORESE EN ELECTRO-OSMOSE

*d* BESCHRIJVING VAN DE METHODIEK

*e* QUALITATIEF EN QUANTITATIEF ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-FRACTIES

*f* EIGEN ONDERZOEK VAN DE AMIDOZWART KLEURSTOFBINDING AAN ZUIVERE SERUMEIWIT-FRACTIES

*g* EIGEN ONDERZOEK VAN DE GEMIDDELDE RELATIEVE WAARDEN BIJ 50 NORMALE PERSONEN. STANDAARDDEVIATIES. BOVEN- EN ONDERGRENZEN VAN NORMAAL.

*h* VERGELIJKING MET GEMIDDELDE RELATIEVE WAARDEN VAN ANDERE ONDERZOEKERS

*i* VERGELIJKING MET DE STANDAARDDEVIATIES VAN ANDERE ONDERZOEKERS

*f* EIGEN ONDERZOEK NAAR DE REPRODUCEERBAARHEID EN FOUTENGRENZEN VAN DE METHODE.

Electrophorese is het verschijnsel van beweging van geladen deeltjes onder invloed van een electrisch veld. Als men in een vloeistof deeltjes suspendeert en twee polen in de vloeistof brengt, waartussen een spanningsverschil bestaat, dan bewegen de deeltjes zich naar de positieve pool als ze negatief geladen zijn.
Heeft men een gekleurde suspensie van deeltjes dan is zelfs met het blote oog te zien, dat de gezamenlijke deeltjes zich verplaatsen. Dit kan worden verwezenlijkt in de U-vormige buis van NERNST (1897). Men brengt hierin de te onderzoeken gekleurde suspensie op zodanige wijze, dat boven de gekleurde suspensie een laag van hetzelfde oplosmiddel zonder deeltjes staat. In deze bovenstaande lagen steken twee electroden; wordt nu een potentiaal verschil tussen deze electroden aangebracht, dan beweegt zich de suspensie naar één zijde, hetgeen men volgen kan door de beweging van het grensvlak tussen oplosmiddel en suspensie na zekere tijden vast te stellen.
Men kan dit verschijnsel ook waarnemen door de deeltjes te volgen door middel van een microscoop of ultramicroscoop.
Zijn de deeltjes te klein en microscopisch niet aantoonbaar, dan kan men met andere methoden toch nog deze grensvlakken aantonen. Men maakt dan gebruik van eigenschappen van een groep deeltjes, waardoor deze door middel van refractie of fluorescentie aantoonbaar zijn. De positie van deze groep deeltjes in de vrije oplossing kan bepaald worden door een horizontale lichtbundel te laten vallen op het horizontale grensvlak. Hierdoor wordt deze lichtbundel afgebogen, daar de refractie in de onderste laag hoger is dan in de bovenstaande laag. De electrophoretische analyse van beweging en scheiding van geladen deeltjes is op deze wijze in wezen een optische waarneming van grensvlakken.
TISELIUS (1937 *a*) bracht vanaf 1937 een reeks belangrijke verbeteringen aan, waardoor het onderzoek van eiwitten en dus ook van plasma of serum mogelijk werd. Door nauwkeurige vaststelling van de buffer-oplossing, de waterstofionenconcentratie, de ionensterkte, temperatuur (4°C) en bovenal door verfijning van de optische meetmethoden is het gelukt electrophorese diagrammen van de eiwitfracties van het bloedplasma te verkrijgen. Deze vorm van electrophorese waaraan de naam van TISELIUS verbonden is, wordt ook wel grensvlak, vrije of klassieke electrophorese genoemd.
Met deze vrije electrophorese, zoals deze plaats vindt in een vrije oplossing in de U-vormige apparatuur, kan een nauwkeurige bepaling van de loopsnelheden, alsook van de concentraties van de verschillende te onderzoeken eiwitfracties verkregen worden. Convectie tengevolge van de zwaartekracht verhindert echter een volledige scheiding.
Hiervoor is een immobiel medium vereist, zoals dit verwezenlijkt kan worden in een nieuwe methode, die sinds enkele jaren ons ten dienste staat. De electrophorese vindt hier plaats in een immobiel medium, het capillairsysteem van filtreerpapier. Deze methode, die hierna besproken zal worden, wordt papierelectrophorese genoemd.

De Tiselius-methode is hierdoor geenszins verdrongen en blijft in vele opzichten van bijzondere waarde voor speciale onderzoekingen.
Terwijl tot voor kort voor de electrophoretische analyse een zeer kostbare apparatuur vereist was, slechts in enkele onderzoekingscentra in ons land aanwezig, de laatste jaren is door de papierelectrophorese deze methode van analyse ook toegankelijk voor het klinisch laboratorium.

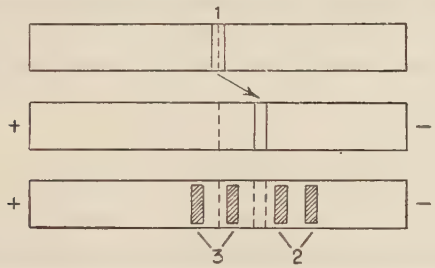
### *b* ELECTROPHORESE IN EEN CAPILLAIR SYSTEEM

De – nu reeds enkele jaren na zijn ontstaan – zo bekend geworden papierelectrophorese is in wezen, wat het idee betreft om electrophorese experimenten uit te voeren in een capillair systeem, reeds zeer oud. In 1907 namen FIELD en TEAGUE (1907) de beweging van diphtherie toxine en antitoxine in een agar gel waar. Zo werden ook de bewegingen van anorganische ionen in agar bestudeerd, gebruikmakend van experimenten in een capillair systeem van agar gel, voor de scheiding van zeldzame aarden (KENDALL et al. 1926). Daar het echter onmogelijk bleek toentertijd om nauwkeurige gegevens over de bewegingssnelheden van de te analyseren stoffen te verkrijgen, werd deze techniek weer verlaten om plaats te maken voor de techniek met vrije oplossingen ter analysering van mengsels van eiwitten en andere stoffen van hoog moleculair gewicht (TISELIUS 1937 *a*).
Toen de behoefte in de kliniek vooral meer uitging naar een analytische methode dan naar een nauwkeurige bepaling van bewegingssnelheden van eiwitstoffen, werd de techniek met het capillaire systeem wederom ter hand genomen. De pionier op dit gebied is COOLIDGE (1939), die in 1939 reeds serumfracties scheidde in zones in een electrophorese-apparaat gevuld met een capillair medium van glaswolpoeder.
Het heeft tot 1948 geduurd, voordat WIELAND en FISCHER (1948) de papierelectrophorese introduceerden. In de hierop volgende twee jaren verschenen de publicaties van de andere medegrondleggers van deze over de gehele wereld bekend geworden analytische methode, van waarde zowel in klinische als in zuiver wetenschappelijke laboratoria (TURBA en ENENKEL 1950; DURRUM 1950; CREMER en TISELIUS 1950; GRASSMANN en HANNIG 1950; KUNKEL en TISELIUS 1951; DURRUM 1951; GRASSMANN en HANNIG 1951; FLYNN en DE MAYO 1951).
Dat deze electrophorese-techniek in een capillair systeem na COOLIDGE (1939) pas in 1948 wederom door WIELAND en FISCHER is ter hand genomen, vindt zijn verklaring wellicht in de zo belangrijke uitvinding van CONSDEN, GORDON en MARTIN in 1944. Deze werkers in een wolcentrum in Leeds maakten op ingenieuze wijze van filtreerpapier gebruik als capillair medium voor de scheiding van aminozuren en peptiden, voortbouwend op de door MARTIN en SYNGE (1941) ingevoerde chromatographie van twee vloeibare phasen in een zuil van silicagel. CONSDEN, GORDON en MARTIN publiceerden in 1944 de eerste voorlopige mededeling over papierchromatographie.
Toen dus filtreerpapier bruikbaar bleek voor de analyse van aminozuren in een capillair-systeem, heeft dit de stoot gegeven tot verdere uitwerking van de electro-

phorese in het capillair-systeem van het filtreerpapier. Op voorstel van TISELIUS (1952) wordt de papier-electrophorese, daar hiermede een scheiding wordt verkregen in zones, in tegenstelling tot de vrije of grensvlak-electrophorese, voortaan zone-electrophorese genoemd.

### *c* ELECTROPHORESE EN ELECTRO-OSMOSE

Nauw verbonden aan het verschijnsel der electrophorese is het phaenomeen der electro-osmose.
We spreken van electro-osmose wanneer een stroming optreedt aan de wand van een capillair systeem, indien dit onder invloed staat van een electrisch veld.
De stroomrichting wordt bepaald door de $\zeta$ potentiaal van de wand. Deze geeft een autonome stroom naar de negatieve pool. Bij iedere electrophorese vindt aan het grensvlak van de vloeistofwand een electro-osmose plaats, die de vloeistoflaag in beweging brengt. Bij filtreerpapier vindt dit plaats aan de grensvlakken van de capillairen van het papier. De richting van deze vloeistofstroom is naar de kathode; men spreekt van electro-osmotische stroming naar de kathode.
Bij een strook filtreerpapier kan het als volgt geïllustreerd worden:



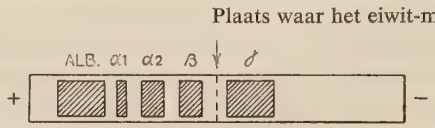

1. mengsel
2. + geladen componenten
3. – geladen componenten

Bij de grensvlak-electrophorese is het verschijnsel der electro-osmose kleiner daar de begrenzende wanden van het systeem relatief veel kleiner zijn dan de hoeveelheid vloeistof. Bij gebruikmaking van filtreerpapier is de totale begrenzende wand, d.w.z. alle wanden van het gehele capillaire systeem, veel groter dan bij de grensvlak-electrophorese en zodoende het verschijnsel der electro-osmose sterker. Bij de papier-electrophorese van serumeiwitten zal het verschijnsel der electro-osmose zich als volgt openbaren. Het gedrag van de eiwitfracties bij de electrophorese is afhankelijk van hun iso-electrische punten.

### OVERZICHT VAN DE ISO-ELECTRISCHE PUNTEN

| *Menselijk plasma* (STENHAGEN 1938) | | *Paardenserum* | |
|---|---|---|---|
| Albumine | pH 4.64 | pH 4.8 | (KEKWICK 1938) |
| Alpha globuline | pH ± 4.8 *) | pH 5.06 | (TISELIUS 1937) |
| Beta globuline | pH ± 5.2 *) | pH 5.12 | |
| Fibrinogeen | pH ± 5.4 *) | | |
| Gamma globuline | pH ± 6.4 *) | pH 6.– | |

De in het voorgaande met * gemerkte fracties werden niet tevoren geïsoleerd en deze waarden verschillen iets van de waarden verkregen met geïsoleerde fracties door „mutual interaction".
Bij deze *pH* gedragen de colloiden zich noch als anion noch als kation; het aantal positief geladen aminogroepen en negatief geladen carboxylgroepen van een eiwitstof zijn hier gelijk.
Bij een *pH* van het buffersysteem van b.v. 8.6 zijn de eiwitfracties alle negatief geladen en albumine heeft hierbij het grootste aantal negatieve carboxylgroepen-hierop volgen $\alpha_1$, $\alpha_2$, $\beta$, en $\gamma$ globuline. Als we te doen zouden hebben met een zuivere electrophorese, zouden we verwachten dat deze 4 fracties alle naar de anode zouden lopen. Aangezien aan deze electrophorese, zoals boven beschreven, onafscheidelijk een electro-osmose verbonden is zal de verdeling bij *pH* 8.6 als volgt worden:




Het *lijkt* dus alsof gamma globuline naar de kathode loopt en zich bij *pH* 8.6 dus als een positief geladen deeltje gedraagt. Dit is dus slechts schijn; het is ook negatief geladen en komt omdat alle fracties door de electro-osmose naar de kathode getrokken worden aan de tegenovergestelde zijde terecht. Voor de praktijk is dit verschijnsel der electro-osmose geen bezwaar.

*Vergelijking van de grensvlak- en zone-electrophorese.*
In tegenstelling tot de electrophorese in een U-buis is bij de papier-electrophorese een volledige scheiding der componenten mogelijk mits de concentraties niet te hoog zijn. Hieraan kan dus als voordeel worden toegevoegd dat men met veel lagere concentraties kan werken dan bij de vrije electrophorese waar een zekere minimale concentratie is vereist voor de stabiliteit van de grensvlakken t.o.v. convectie.
De z.g. grensvlak-moeilijkheden komen bij de papier-electrophorese niet voor. Deze grensvlak-anomalieën die zich uiten in een verschil van scherpte en loopsnelheid in de twee benen van de U-vormige buis kunnen grove fouten veroorzaken en electrophoretische bepalingen onmogelijk maken. Voor eiwitstoffen zijn deze bezwaren niet zo groot als voor b.v. aminozuren, waarbij de fout zo groot kan worden dat het experiment waardeloos is.
Aminozuren, peptiden en vele andere stoffen met een laag moleculair gewicht kunnen daarentegen in de zone-electrophorese gemakkelijk worden bestudeerd.
Tegenover dit voordeel van de zone-methode staat echter dat voor de accurate bepaling van de loopsnelheden de vrije electrophorese superieur is. Dit is in de eerste plaats gelegen in het medium bij de zone-electrophorese, het filtreerpapier. De samenstelling van het filtreerpapier is zeker niet homogeen te noemen zodat de geladen deeltjes zich niet zo gelijkelijk kunnen bewegen als in een homogeen medium. Men kan zich voorstellen dat plaatselijk capillairen van het papier ondoor-

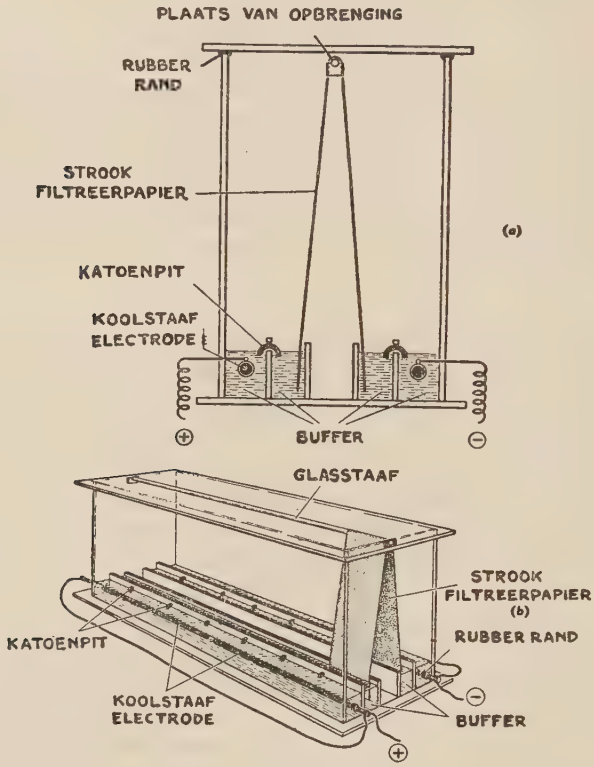
gankelijk zijn, zodat op enkele plaatsen de bewegingsmogelijkheid in het electrisch veld niet homogeen is.
Daar de electro-osmotische tegenstroom bij de zone-electrophorese aanzienlijk is, wordt hierdoor een exacte bepaling van de loopsnelheden van de eiwitstoffen zeer moeilijk.
Dit probleem is van speciaal belang als men van de zone-electrophorese gebruik wenst te maken voor het identificeren van onbekende componenten. Toch is bepaling van de loopsnelheden zeer redelijk mogelijk (TISELIUS 1952), indien voor de electro-osmotische tegenstroom een correctie wordt aangebracht.
Hiervoor voegde TISELIUS een stof van bekende loopsnelheid als indicator aan het te bepalen eiwitmengsel toe. Hij koos hiervoor dextran, dat ongeladen is en dus geen beweging vertoont en evenals de eiwitfracties met broomphenolblauw kan worden aangetoond.
Een andere moeilijkheid bij de zone-electrophorese is, dat er een adsorptie van de bewegende eiwitdeeltjes aan het medium, i.c. het filtreerpapier, kan plaats vinden, zodat geen goede scheidingen worden verkregen. Bij het onderzoek van sera kwam dit zelden voor, wel echter bij het onderzoek van visceusere stoffen zoals gewrichtsvloeistof. De zone-electrophorese van gewrichtsvloeistof (hoofdstuk X) mislukte nogal eens, doordat geen goede scheidingen werden verkregen door deze adsorptie van de eiwitstoffen aan het filtreerpapier.
Grote waarde moet worden toegekend aan de kwaliteit van het filtreerpapier. In dit onderzoek werden alle bepalingen verricht met één papiersoort, t.w. Whatman no. 1.
TISELIUS (1952) laat zich over zone-electrophorese als volgt uit: 'Zone-electrophorese in immobiele media is een aanwinst van groot belang en heeft zekere duidelijke voordelen boven de vrije electrophorese, in het bijzonder voor de mogelijkheid om met kleine hoeveelheden te werken en volledige scheidingen te verkrijgen. Een zeer eenvoudige apparatuur is vereist en het is onder geschikte omstandigheden zeer goed mogelijk quantitatieve bepalingen te verrichten.' De quantitatieve methode waarbij de kleurstof wordt geëlueerd is uitermate eenvoudig en verrassend nauwkeurig (KUNKEL, TISELIUS 1951).
De methode komt in biochemische en chemische laboratoria steeds meer in algemeen gebruik voor de studie van eiwitten, nucleine zuren, nucleotiden, polypeptiden, peptiden en aminozuren.

### *d* BESCHRIJVING VAN DE METHODIEK

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van de techniek van FLYNN en DE MAYO (1951).
Het quantitatieve deel wijkt af van de door FLYNN en DE MAYO beschreven techniek. Hiervoor werd een eigen methode toegepast, zoals hieronder wordt beschreven. Het quantitatieve gedeelte van dit gehele onderzoek werd door mijzelf verricht, aangezien het mij raadzaam voorkwam dit in één hand te houden. Voor het qualitatieve deel verkreeg ik de hulp van de analyste Mej. H. Floberg.

*Electrophorese-box*

Deze werd vervaardigd van perspex. De maten zijn: Lengte 45 cm, Breedte 12 cm, Hoogte 20 cm




Een zware glasplaat rustend op een rubber omranding sluit de box af. Op de basis van de box worden in de lengte 4 perspex tussenschotten aangebracht over een hoogte van ± 4 cm, zodat er een verdeling in 5 compartimenten is. Elk van deze compartimenten, de middelste uitgezonderd, bevat de bufferoplossing. De twee buitenste bevatten de koolstof-electroden die aan weerskanten door de zijwanden naar buiten steken, door een isolatie-systeem waterdicht gemaakt. De twee buitenste tussenschotten hebben ieder 6 gaten (diameter 3 mm) op onderling gelijke afstanden, even onder de bovenrand. Katoenpitten vullen deze gaten op en dompelen beiderzijds in de bufferoplossing. Hierdoor worden de buitenste en binnenste compartimenten electrisch met elkaar verbonden, zodat voorkomen wordt dat *pH* veranderingen, die optreden bij de electroden in de buitenste compartimenten, de binnenste compartimenten bereiken.

Een dunne glasroede is 19.5 cm boven de basis, even onder het midden van de dekplaat en in de lengte van de box aangebracht. Hierover kunnen 8 filtreerpapierstroken (36 x 4 cm) naast elkaar geplaatst worden, zodat het midden van iedere

strook over de glasroede ligt en de uiteinden aan weerszijden in de binnenste compartimenten met de bufferoplossing in contact komen.
De stroombron is 110 Volt gelijkstroom-spanning. In het Wilhelmina Gasthuis kon gebruik gemaakt worden van speciale gelijkstroom-lichtpunten. Een milli-ampèremeter wordt tussengeschakeld.

*Bufferoplossing:*
De buffer in dit onderzoek was altijd dezelfde. Veronal buffer van *pH* 8.6.
*Samenstelling*: Veronal-*Na* 0.05 M (10.3 gr per liter), Veronal 0.01 M (1.84 gr per liter).
Voor ieder onderzoek werd een nieuwe bufferoplossing gemaakt.

*Filtreerpapier:*
Alle onderzoekingen werden verricht met Whatman no. 1. De andere voor dit doel onderzochte papiersoorten voldeden minder.

### *e* QUALITATIEVE EN QUANTITATIEVE TECHNIEK

De vier compartimenten van de box worden gevuld met de bufferoplossing, zodat de katoenpitten ondergedompeld zijn. Hiervoor is één liter bufferoplossing nodig, iedere keer vers bereid. In elk van de compartimenten moet evenveel buffer zijn. Acht filtreerpapierstroken van 36 cm lengte en 4 cm breedte worden op bovenomschreven wijze geplaatst, zodat aan weerszijden de uiteinden met de bufferoplossing in de binnenste compartimenten in contact komen.
Er is voor acht stroken voldoende plaats zonder dat de stroken elkaar onderling raken. Nu wordt ongeveer een uur gewacht totdat de filtreerpapierstroken door capillaire werking geheel verzadigd zijn met de bufferoplossing. Hierna worden de vloeistofspiegels wederom op gelijke hoogte gebracht.
Nu kan de te onderzoeken homogene vloeistof opgebracht worden. Afhankelijk van de eiwitconcentratie van de te onderzoeken stof moet de hoeveelheid gekozen worden. Voor de normale waarden van totaal serumeiwit, $\pm$ 7 gr %, mag niet meer dan 0.01 ml opgebracht worden. Wordt meer opgebracht dan is het moeilijker later de kleurstof te elueren. Het opbrengen geschiedt met geijkte micropipetten, ter plaatse van het midden van de papierstrook, in een zeer smalle band over de gehele breedte van het papier, uitgezonderd de uiterste randen.
Afhankelijk van de kamertemperatuur werd de electrophorese uitgevoerd gedurende 17 à 18 uur bij een spanning van 110 Volt en bij een stroomsterkte van 3 mA. Hierna worden de strips voorzichtig uit de box gehaald, waarbij vooral moet worden zorggedragen dat er geen contact plaats vindt tussen de strips onderling en tussen gedeelten van eenzelfde filtreerpapierstrook. Het beste is om de strips direct in een metalen raam tussen klemmetjes te plaatsen, waarna gedurende een kwartier bij 110° C wordt gedroogd. Hierdoor wordt het eiwit gecoaguleerd in het filtreerpapier. Hierna kan de kleuring plaats vinden.

*Kleurtechniek*
Gedurende 10 minuten wordt gekleurd in een bad met een verzadigde oplossing

van Naphthalene Black *(B. D. H.)* in methylalcohol-ijsazijn (9:1). Deze kleurstof staat ook bekend onder de naam Amidozwart 10 *B* (Bayer).
Het is van belang dat iedere strook precies 10 minuten wordt gekleurd. Het is derhalve het beste steeds slechts één strook tegelijk in het naphthalene-black bad te kleuren. Na 10 minuten kleuring is de strook egaal donkerblauw; er is nu nog niets te zien van de scheiding der eiwitfracties. Het naphthalene-black bad kan weer gebruikt worden voor het kleuren van de volgende strook.
Hierna wordt de strook in een groot bad van methylalcohol-ijsazijn (9:1) gelegd om te ontkleuren. In dit ontkleuringsbad kunnen enkele stroken tegelijk gelegd worden.
Door deze ontkleuring worden de eiwitvrije gedeelten van de strook, waarvan de cellulose eveneens kleurstof heeft geaddeerd, uitgewassen. Nu komen de eiwitfracties als blauwe banden tegen een lichtblauwe ondergrond te zien. Bij dit ontkleuren moet het bad geregeld bewogen worden. Daar al spoedig veel kleurstof uitgewassen wordt en de kleurstofconcentratie in het bad te hoog wordt, moeten de stroken in verse baden methylalcohol-ijsazijn (9:1) enkele malen worden overgebracht. Het laatste bad moet practisch kleurloos blijven, wil men zeker zijn dat voldoende ontkleurd is. Dit is voor de quantitatieve bewerking van groot belang. Voor de volledige ontkleuring zal ongeveer een half uur nodig zijn. Tot slot wordt het azijnzuur verwijderd door zeer kort te wassen in een bad met methylalcohol. Het gedeelte van het papier dat eiwitvrij is, blijft zeer lichtblauw. Het wassen met aqua dest. moet op grond van enkele onderzoekingen hiernaar verricht ten stelligste ontraden worden. Het aan eiwit gebonden amidozwart laat in water los, zodat er verlies optreedt en dientengevolge foutieve uitkomsten verkregen worden. Als uitwasmiddel is een waterige oplossing van 3–5 % phenol met 10 % ijsazijn ook geschikt. (GRASSMANN 1952). De ontkleuring geschiedt hiermee sneller. Door de kleuring met amidozwart wordt een fraaie intensieve kleuring verkregen.

*Quantitatief onderzoek*
Alle in dit onderzoek voorkomende waarden van de relatieve percentages werden op hieronder beschreven wijze verkregen.
De quantitatieve bewerking van de stroken werd bij alle bepalingen door mijzelf verricht.
Alleen die stroken werden quantitatief uitgewerkt waarbij goede scheidingen van de diverse fracties werden verkregen.
Plasma is niet te onderzoeken omdat de fibrinogeen-zone op het terrein van het gamma I globuline treedt en dus niet afzonderlijk te bepalen is. De plaats van het fibrinogeen is zoals de vrije electrophorese ons geleerd heeft tussen de $\beta$ en $\gamma$ globuline in en ligt bij de zone-electrophorese op het gebied van de gamma I fractie.
De scheiding van de andere fracties ten opzichte van elkaar is doorgaans zeer goed. Zodra er sprake is van staartvorming van het albumine loopt de $\alpha_1$ fractie gevaar hierdoor gedeeltelijk overdekt te worden. De strook wordt in 5 zones verdeeld en uitgeknipt. Voor elke zone wordt een blanco van dezelfde grootte geknipt. Deze filtreerpapiersegmenten worden in verdeelde buizen geplaatst, waarna in de albumi-

ne buis 20 ml en in de andere buizen elk 10 ml aqua dest. wordt gepipetteerd. De buizen worden in metalen rekken gedurende 15 minuten in een kokend waterbad geplaatst. Het blijkt dan bij het uithalen van de diverse segmenten dat de kleurstof quantitatief kan worden geëlueerd. Een enkele maal moest, omdat de kleurstofconcentratie te hoog was, een tweede maal geëlueerd worden. Te allen tijde kon zo een totale quantitatieve elutie worden verkregen, onder voorwaarde dat van niet meer dan 0.7 mg eiwit werd uitgegaan. Dit komt voor normaal serum neer op ongeveer 0.01 ml serum.
Nadat zo alle kleurstof geëlueerd is, moeten de papiertjes uit alle buizen bij kooktemperatuur verwijderd worden. Het is mij namelijk gebleken dat het papier bij afkoeling wederom kleurstof addeert. Niet het eiwit maar alleen de kleurstof wordt uit het papier geëlueerd. Na ontkleuring van een van tevoren gemerkte eiwitvlek kon worden aangetoond, dat door opnieuw te kleuren hetzelfde gebied op gelijke wijze gekleurd wordt. Deze hernieuwde kleuring vindt ook plaats door het papier dat bij kooktemperatuur ontkleurd is in het afgekoelde eluaat te laten, waardoor wederom kleurstof geaddeerd wordt.
Nauwkeurig moet er voor worden zorggedragen dat zo min mogelijk vloeistof in het papier achterblijft, door de papiertjes tegen de wand van de buis te laten uitlekken en tot slot uit te knijpen. Na afkoeling worden de buizen op de oorspronkelijke volumina teruggebracht. Door het koken is er wat vloeistof verdampt. Hierdoor is voor de buizen met 10 ml minder dan 0.1 ml en voor de buizen met 20 ml minder dan 0.2 ml aqua dest. nodig. Nu wordt van iedere buis de extinctie gemeten in een photo-electrische colorimeter bij 590 m $\mu$ en de verhoudingen bepaald van de verschillende fracties. Aangezien deze aan te vullen hoeveelheid voor alle buizen nagenoeg gelijk was, heb ik aan de hand van enkele bepalingen kunnen aantonen dat de fout die men maakt als niet wordt aangevuld, te verwaarlozen is.
Deze elutie-methode is stellig nauwkeurig. Ook als de diverse zones niet geheel rechthoekig zijn, is een accurate bepaling nog zeer goed mogelijk. Kleine onregelmatigheden van de zones zijn geen bezwaar bij deze methode en beïnvloeden de reproduceerbaarheid niet.
KUNKEL en TISELIUS (1951) zeggen van de elutie-methode: 'extremely simple and surprisingly accurate'.
Hieraan kan echter worden toegevoegd dat deze methode bijzonder tijdrovend is. In 3 uur tijd worden 8–10 strips quantitatief uitgewerkt. Daar het kan voorkomen dat men van bijzondere sera later nog eens het macroscopisch aspect wil bezien, vooral als men met pathologische fracties te doen heeft, verdient het aanbeveling naast een quantitatieve bepaling een strook te bewaren voor het macroscopisch aspect.
Aangezien in de laatste jaren snellere methoden zijn beschreven, meen ik goed te doen hiervan een kort overzicht te geven. Om de uniformiteit van het onderzoek niet te benadelen heb ik vastgehouden aan de bovenbeschreven methode.

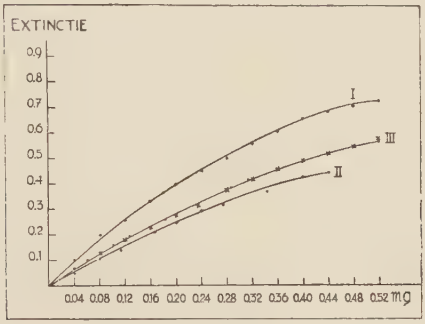
*Andere methoden voor quantitatieve techniek van de zone-electrophorese*
*Indirecte colorimetrie:* FLYNN en DE MAYO (1951) maken bij de quantitatieve

bepaling gebruik van de methode om de stroken op te knippen in $\frac{1}{2}$ cm strookjes na kleuring met broomphenolblauw.
De elutie vindt plaats in buizen met 5 ml methylalcohol die 4 % natriumcarbonaat bevat.
Door het knippen van $\frac{1}{2}$ cm strookjes kunnen fouten gemaakt worden, daar het herhaaldelijk zal voorkomen dat de grenzen van twee naast elkaar liggende fracties in één strook gelegen zijn, zodat de scheiding van deze fracties verloren gaat. Men verkrijgt zo een irreëel beeld.
Van iedere buis wordt de extinctie bepaald en in curve uitgezet. Op deze wijze wordt een curve verkregen die iets gelijkt op de curve van de vrije electrophorese. Het is direct duidelijk dat bij een wat gebogen karakter van de zones in diverse halve centimeter-strookjes, behalve de fractie die gemeten moet worden ook nog een uitloper van een aangrenzende fractie wordt meebepaald.
Bij deze methode, en dat geldt voor alle hierna besproken direct colorimetrische bepalingen in het bijzonder, worden nog grotere eisen gesteld aan het rechthoekig karakter van de zones.

*Directe colorimetrie van met broomphenolblauw, azocarmijn of amidozwart gekleurde diagrammen.*
*1.* GRASSMANN et al. (1951) kleurt met amidozwart en maakt de stroken met een mengsel van paraffine–olie en $\alpha$ broomnaphthaline transparant en leidt deze stroken langs een spleet van een colorimeter en meet de extincties.
*2.* Stroken met broomphenolblauw of azocarmijn gekleurd, worden direct zonder dat ze transparant behoeven te worden gemaakt, langs de 1 mm brede spleet van een photo-electrisch systeem geleid. De zones mogen bij de directe colorimetrie geen grillige figuren vertonen.
Voor alle kleurstoffen geldt dat de wet van Lambert-Beer gevolgd wordt, zolang de extinctie niet boven 0.8 komt (GRASSMANN en HANNIG 1952).
Bij de analyse van sera zal men doorgaans binnen dit bereik vallen. Boven extinctie 0.8 moet een correctie worden aangebracht.

*De kleurstofbinding van de verschillende eiwitfracties*
Bij de quantitatieve bewerking van de stroken worden de kleurintensiteiten van de afzonderlijke fracties vergeleken. Hieruit wordt de verhouding van de eiwitconcentraties van de fracties afgeleid. De vraag is dus of het kleurstofbindend vermogen van de verschillende eiwitfracties ook bepalend is voor de concentratie.
Voor de kleurstofbinding van de verschillende eiwitten zijn chemische eigenschappen van het betreffende eiwit verantwoordelijk (zie hieronder).
Het is dus van groot belang te weten welke kleurstofbindingscapaciteit één gewichtseenheid van een eiwitfractie heeft, vergeleken met een zelfde gewichtseenheid van een andere eiwitfractie.
IJkingscurven van albumine, alpha, beta en gamma globuline werden gemaakt door KUNKEL en TISELIUS (1951) en GRASSMANN en HANNIG (1952). Op pagina 21 wordt deze ijkingscurve naar GRASSMANN-HANNIG (1952) getoond.

*IJkingscurve*
voor albumine (I), $\alpha$ (III . . .), $\beta$ (II) en $\gamma$ globuline (IIIXXX) naar GRASSMANN. Amidozwart 10 B.




De ijkingscurve van albumine blijkt bij de elutie-methode hoger te liggen dan de curven van alpha, beta en gamma globuline. De curven van alpha en gamma globuline vallen samen. De curve van beta globuline blijkt hier weer iets onder te liggen. KUNKEL en TISELIUS (1951) vonden nagenoeg hetzelfde.
Voor de geringe afwijking in het lineair verloop wordt door GRASSMANN-HANNIG (1952) geen correctiefactor ingevoerd. Voor de mindere kleurbaarheid van de globuline-fracties vergeleken met het albumine moet wel een correctiefactor worden aangebracht (zie blz. 24)
Dat voor de kleurstofbinding van de verschillende eiwitten chemische eigenschappen van het betreffende eiwit verantwoordelijk zijn en wel in hoofdzaak het aantal basische groepen, wordt door GRASSMANN en HANNIG (1952) aangetoond in een proef met clupeinsulfaat. Op grond van het basisch karakter moet clupeinsulfaat een tweemaal zo hoge bindingsmogelijkheid hebben als het serum albumine. In de ijkingscurve blijkt de extinctie van een gewichtseenheid clupeinsulfaat ook inderdaad tweemaal zo hoog te zijn als van albumine. Men moet derhalve zodra andere eiwitstoffen b.v. slangen- of insecten-toxines onderzocht worden, eerst van deze stoffen het zuurbindend vermogen bepalen, wil men quantitatieve conclusies kunnen trekken.
Ditzelfde geldt in de menselijke pathologie bij electrophorese van para-proteinen van myeloom sera of van makroglobulinen.
Bij deze bijzondere eiwitten, zoals bijvoorbeeld het gamma globuline bij de ziekte van Kahler, kennen wij ook het kleurstofbindend vermogen niet. We zouden dit dus eerst moeten bepalen voordat de concentratie kan worden uitgerekend.
Het is dan ook mijn eigen ervaring, evenals van vele anderen (GRASSMANN en HANNIG 1952, FLYNN en DE MAYO 1951, RIVA en MARTINI 1953) dat de vergelijking van myeloom sera bepaald met de zone- en vrije electrophorese minder goede overeenkomst geeft dan in het algemeen het geval is bij sera die weliswaar pathologisch zijn, maar die voorzover wij weten geen abnormale eiwitstoffen bevatten (zie hoofdstuk II).

## *f* EIGEN ONDERZOEK VAN DE AMIDOZWART KLEURSTOFBINDING AAN ZUIVERE SERUMEIWIT-FRACTIES.

Het Centraal Laboratorium van het Ned. Rode Kruis stelde mij hiervoor albumine, alpha, beta en gamma globuline ter beschikking, gefractionneerd volgens de methode van COHN.
Bij zone-electrophorese van albumine bleek evenals bij het onderzoek van $\beta$ en $\gamma$ globuline, dat deze stoffen geen andere fracties bevatten. Het 'alpha globuline' bleek – zoals ook te verwachten – niet geheel zuiver; bij electrophorese waren twee banden te zien, één op de alpha plaats en één zwakkere op de beta plaats.
Bij het onderzoek naar de kleurbaarheid van zuivere fracties heb ik deze berekend door uit te gaan van bekende volgens Kjeldahl bepaalde eiwitconcentraties. De bekende Kjeldahl-waarden van een mengsel van twee of meer eiwitfracties worden vergeleken met de extincties, na elutie van de door electrophorese gescheiden fracties. Gegeven is dus de verhouding van de stikstofconcentraties; onderzocht wordt de verhouding der extincties na electrophorese.
Door op deze wijze de onderlinge verhoudingen van de extincties aan de éne zijde en de stikstofconcentratie aan de andere zijde te vergelijken, wordt een pipetteerfout vermeden. Het is nu van geen belang of we 0.01 of 0.0075 ml van het mengsel op de filtreerpapierstrook hebben opgebracht.
Door nu de kleurbaarheidsfactor van albumine op 1 te stellen, wordt de factor van de te onderzoeken globuline-fracties gevonden.

*Onderzoek naar de mate van kleurbaarheid van de globuline-fracties, vergeleken met albumine* (zie pagina 23).
Hiervoor werden mengsels gemaakt van verschillende hoeveelheden van de volgende oplossingen:

| | | |
|---|---|---|
| Albumine | 17.20 gr $^0/_{00}$ | |
| 'Alpha' globuline | 12.54 gr $^0/_{00}$ | (bestaat dus voor een zeer klein deel uit beta globuline) |
| Beta globuline | 6.09 gr $^0/_{00}$ | |
| Gamma globuline | 18.20 gr $^0/_{00}$ | |

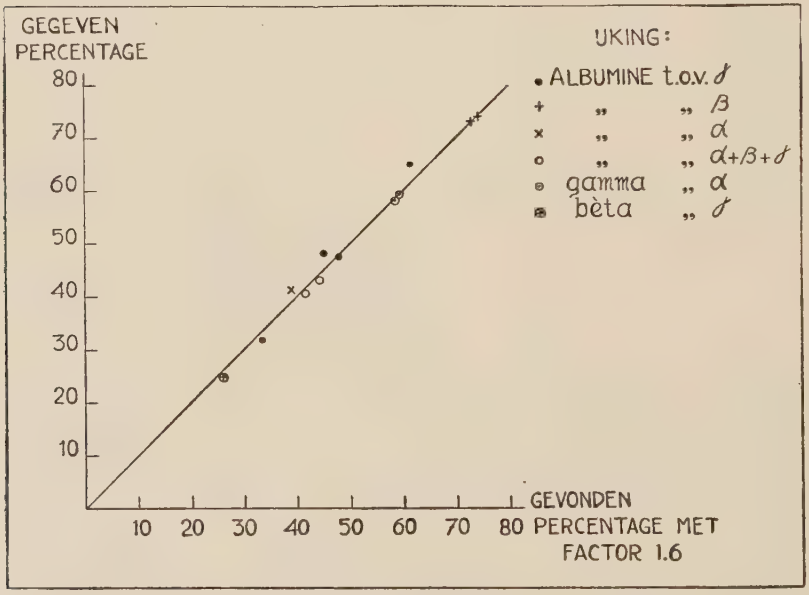
Eiwitconcentraties bepaald volgens Kjeldahl.

*Vergelijking met de uitkomsten door andere onderzoekers gevonden.*
KUNKEL en TISELIUS (1951) vonden dat de factor voor gamma globuline 1.3 bedraagt.
GRASSMANN en HANNIG (1952) vinden bij de kleuring met amidozwart 10 *B* (Bayer) dat:
1 mg albumine ongeveer 0.4 mg amidozwart en
1 mg $\gamma$ globuline ongeveer 0.5 mg amidozwart bindt.
1 gram molecuul amidozwart bindt dan 880 mg albumine, resp. 1230 mg gamma globuline. Dit komt neer op een correctiefactor 1.4 voor gamma globuline. Deze onderzoekers vonden tevens dat de kleurbaarheid van beta globuline iets geringer

| Mengsel | Gegeven relatieve concentraties van het mengsel | Gevonden extincties | Theoretisch verwachte extinctie van globuline fractie, indien deze dezelfde kleurbaarheid zou hebben als albumine | Berekende factor, waarmede de globuline extinctie vermenigvuldigd moet worden |
|---|---|---|---|---|
| 1. Alb.<br>γ Glob. | 48 %<br>52 % | 220<br>170 | 238 | $\frac{238}{170} = 1.4$ |
| 2. Alb.<br>γ Glob. | 48 %<br>52 % | 347<br>230 | 375 | $\frac{375}{230} = 1.6$ |
| 3. Alb.<br>γ Glob. | 65 %<br>35 % | 110<br>43 | 59 | $\frac{59}{43} = 1.4$ |
| 4. Alb.<br>γ Glob. | 32.2%<br>67.8% | 100<br>123 | 207 | $\frac{207}{123} = 1.68$ |
| 5. Alb.<br>β Glob. | 74 %<br>26 % | 505<br>108 | 175 | $\frac{175}{108} = 1.6$ |
| 6. Alb.<br>β Glob. | 74 %<br>26 % | 456<br>104 | 160 | $\frac{160}{104} = 1.54$ |
| 7. Alb.<br>α Glob. | 41 %<br>59 % | 324<br>320 | 460 | $\frac{460}{320} = 1.44$ |
| 8. Alb.<br>α Glob.<br>β Glob.<br>γ Glob. | 40.2%<br>16.–%<br>15.8%<br>28.–% | 289<br>261 | 429 | $\frac{429}{261} = 1.64$ |
| 9. Alb.<br>α Glob.<br>β Glob.<br>γ Glob. | 43.5%<br><br>34.2%<br>22.3% | 386<br><br>190<br>124 | 502 | $\frac{502}{314} = 1.6$ |
| | | | Theoretisch verwachte extinctie bij gelijke kleurbaarheid van de globuline-fracties onderling | |
| 10. α Glob.<br>γ Glob. | 40.5%<br>59.5% | 125<br>182 | 186 | $\frac{186}{182} = 1.–$ |
| 11. α Glob.<br>γ Glob. | 40.5%<br>59.5% | 190<br>280 | 284 | $\frac{284}{280} = 1.–$ |
| 12. β Glob.<br>γ Glob. | 25 %<br>75 % | 95<br>262 | 285 | $\frac{285}{262} = 1.08$ |

* Aangezien α globuline voor een deel uit β globuline bestaat, moeten α- en β globuline samengevoegd worden.

is, zodat hiervoor een grotere factor (± 1.66) gevonden wordt. In de door hen gegeven ijkingscurve wordt voor gamma globuline en alpha globuline een correctiefactor 1.54, voor beta globuline de factor 1.66 gevonden.
Vergelijken we hiermede mijn bevindingen dan meen ik te mogen concluderen dat de kleuring met naphthalene black *(B. D. H.)* ongeveer dezelfde waarden geeft als GRASSMANN en HANNIG vonden met amidozwart 10 *B* (Bayer); ook zij elueerden de kleurstof voor deze proeven.
Hoewel dus de kleurbaarheid van de globuline-fracties onderling niet geheel gelijk is, heb ik de correctiefactor waarmee de extincties van de globuline-fracties moeten worden vermenigvuldigd, gelijkgesteld. De gevonden factoren lopen nogal iets uiteen, tussen 1.4 en 1.68, met een gemiddelde van 1.54.
In onderstaande figuur worden de uitkomsten in grafiek bijeengebracht, indien de correctiefactor voor alle globuline-fracties op 1.6 wordt gesteld.
Het gegeven percentage van het albumine wordt uitgezet tegen het gevonden percentage indien de globuline met de factor 1.6 wordt vermenigvuldigd.
Evenzo wordt gamma globuline ten opzichte van alpha en beta globuline geijkt, zonder dat een correctiefactor wordt gebruikt. Aangezien slechts drie punten buiten de lijn vallen, heb ik gemeend als correctiefactor 1.6 te mogen aannemen, evenals CREMER en TISELIUS (1950) en FLYNN en DE MAYO (1951) hebben gedaan voor broomphenolblauw en GRASSMANN en HANNIG (1952) voor amidozwart 10 *B* (Bayer)



*g* ONDERZOEK NAAR DE GEMIDDELDE RELATIEVE WAARDEN VAN DE SERUMEIWIT-FRACTIES, ONDERZOCHT BIJ 50 NORMALE PERSONEN; STANDAARDDEVIATIES, BOVEN- EN ONDERGRENZEN VAN DE NORMALE WAARDEN.

Bij 50 gezonde personen werd nuchter bloed afgenomen, waarbij ervoor werd zorggedragen dat slechts korte tijd werd gestuwd bij de venapunctie.
Het onderzoek gold vrouwen en mannen, van wie 31 personen tussen 20 en 50 jaar en 19 personen tussen 50 en 70 jaar.
Aangezien in mijn onderzoek bij rheumatische ziekten meer vrouwen dan mannen werden onderzocht, ongeveer in de verhouding 3:2, werd ook bij het onderzoek van de normalen een zelfde verhouding genomen. Aangezien nogal eens op hogere leeftijd een hoger relatief gamma globuline-percentage wordt gevonden, werden met opzet enkele personen tussen 50 en 70 jaar in de groep betrokken.
Tussen deze groepen onderling werden echter geen belangrijke verschillen gevonden.
Voor het berekenen van de verwachte boven- en ondergrenzen werd van de volgende berekening uitgegaan (MOORE en LYNN 1941):
*rekenkundig gemiddelde* ± (2 x standaardfout van het gemiddelde + 2 x standaarddeviatie + 4 x standaardfout van de standaarddeviatie)

$SD = \sqrt{\Sigma(x-\bar{x})^2/N-1}$ $SD$ = standaarddeviatie
Rekenk. gem. $= \Sigma x/N = \bar{x}$

$$SE_{\bar{x}} = \frac{SD}{\sqrt{N-1}}$$ = standaardfout van rekenkundig gemiddelde

$$SE_{SD} = \frac{SD}{\sqrt{2(N-1)}}$$ = standaardfout van de standaarddeviatie
($N$ = aantal bepalingen; $\bar{x}$ rekenkundig gemiddelde)

Te verwachten grenzen voor alle gevallen:
$\bar{x} \pm KSE_{\bar{x}} \pm K(SD + KSE_{SD})$
Kiezen we voor $K = 2$, dan zou de waarschijnlijkheid van de berekende boven- en ondergrenzen 95.4% bedragen. Door echter de te verwachten grenzen volgens deze formules te berekenen, wordt de overschrijdingskans aanzienlijk lager dan $^1/_{20}$, ongeveer in de orde van $^1/_{60}$.*

| | Rekenkundig gemiddelde ($N = 50$) | *S.D.* | Bovengrens | Ondergrens |
|---|---|---|---|---|
| Albumine | 64.– | 3.11 | 72.3 | 55.6 |
| Alpha I | 3.4 | 0.85 | 5.7 | 1.1 |
| Alpha II | 7.6 | 1.64 | 12.– | 3.2 |
| Beta | 10.– | 1.15 | 13.1 | 6.9 |
| Gamma | 15.– | 2.85 | 22.7 | 7.3 |

* De Heer J. Strackee dank ik voor zijn commentaar en adviezen bij dit statistisch gedeelte.

*h Vergelijking met de relatieve waarden door andere onderzoekers gevonden, hetzij met de klassieke Tiselius-techniek, hetzij volgens de methode van micro-electrophorese van Antweiler, of door zone-electrophorese.*

| Onderzoeker | Aantal bepalingen | Buffer *pH* 8.6 | Alb. | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | Techniek |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOLE (1947) | 15 | veronal | 63.5 | 4.8 | 7.5 | 12.7 | 11.5 | Tiselius |
| ARMSTRONG (1947) | 20 | veronal | 58.8 | 5.6 | 9.2 | 14.2 | 12.2 | Tiselius |
| STERLING (1949) | 10 | veronal | 60.3 | 4.– | 9.7 | 12.8 | 13.2 | Tiselius |
| SEIBERT (1947) | 43 | veronal | 53.3 | 8.– | 10.4 | 13.8 | 14.2 | Tiselius |
| F. WUHRMANN (1947) | | veronal | 65-70 | 2.6 | | 9-13 | 13-17 | Tiselius |
| JANSSEN (1951) | | phosphaat | 60.– | 7.4 | | 11.9 | 20.9 | Tiselius |
| HESS (1951) | | veronal | 60.1 | 5.2 | 11.5 | 13.4 | 11.8 | Tiselius |
| TAYLOR (1949) | | veronal | 64.2 | 4.1 | 7.7 | 11.4 | 12.7 | Tiselius |
| SVENSSON (1941) | | veronal | 64.2 | 8.5 | | 16.8 | 10.5 | Tiselius |
| LONGSWORTH (1939) et al. | 4 | veronal | 64.1 | 7.7 | | 14.7 | 13.5 | Tiselius |
| KEKWICK (1940) | 6 | veronal | 62.5 | 5.– | | 11.5 | 21.– | Tiselius |
| MOORE-LYNN (1941) | 12 | veronal | 65.– | 8.3 | | 14.3 | 12.4 | Tiselius |
| OLHAGEN (1947 *a*) | 10 | phosphaat | 58.7 | 7.2 | | 14.5 | 19.6 | Tiselius |
| HARTMANN (1950 *a*) | 130 | veronal | 63.6 | 6.– | 5.8 | 13.1 | 11.5 | micro Antweiler |
| ANTWEILER (1949) | | veronal | 57.9 | 11.8 | | 11.6 | 18.7 | micro Antweiler |
| KÖRVER (1952) | 25 | veronal | 57.8 | 4.5 | 8.2 | 9.6 | 19.9 | zone-electrophorese |
| KUNKEL-TISELIUS (1951) | | veronal | 65.9 | 3.9 | 8.– | 9.– | 13.2 | broomphenolblauw-elutie |
| GRASSMANN (1952) | 25 | veronal | 61.3 | 4.1 | 8.1 | 11.– | 15.5 | amidozwart directe colorimetrie |
| VERSCHURE (1954) | 72 | veronal | 64.– | 11.– | | 9.– | 16.– | azocarmijn *B* elutie |
| Eigen waarden | 50 | veronal | 64.– | 3.4 | 7.6 | 10.– | 15.– | naphthalene black-elutie |

Bij vergelijking van zone-electrophoresewaarden met de waarden door de klassieke Tiselius-techniek verkregen, moet men zich allereerst realiseren dat door de in principe verschillende technieken een vergelijking moeilijk wordt. Bij beschouwing van de overzichtstabel van de normale waarden, valt onder meer op, dat voor het beta globuline volgens de Tiselius-techniek steeds iets hogere percentages worden gevonden dan bij de papier-techniek. De oorzaak hiervan moet hierin worden gezocht, dat het beta globuline voor een deel bestaat uit lipoproteine, waarvan de lipoid component, bij de bepaling van de brekingsgradient volgens Tiselius, mede bepaald wordt en dat zodoende een iets hogere beta waarde wordt gevonden dan bij de zone-electrophorese.
Immers hierbij worden de lipoiden door amidozwart niet gekleurd. Dit is als een voordeel van de papier-electrophorese boven de klassieke Tiselius-methode te beschouwen.
Het komt mij dan ook onjuist voor, om de correctiefactor van beta globuline te construeren uit de gegevens verkregen over het beta globuline-percentage bij de Tiselius-techniek.
Bij beschouwing van de overzichtstabel valt tevens op, dat bij de Tiselius-techniek het gevonden gamma globulinepercentage een variatie vertoont van ± 10–20 %. Deze spreiding zou samenhangen met de verschillende technieken, met name met verschillende buffers (phosphaat of veronal). In het volgende hoofdstuk wordt op de vergelijking 'Tiselius-contra zone-electrophorese' teruggekomen.
Op grond van de overeenkomst met de waarden verkregen door KUNKEL en TISELIUS (1951) en GRASSMANN en HANNIG (1952) wordt voor alle electrophoretische onderzoekingen de correctiefactor 1.6 voor de globuline-fracties gebruikt.

*i Vergelijking van de gevonden standaard deviaties met enkele in de literatuur vermeld*

| | Alb. | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
|---|---|---|---|---|---|
| DOLE (1944) | ± 2.8 | ± 0.7 | ± 1.3 | ± 1.9 | ± 2.5 |
| ARMSTRONG (1947) | ± 1.3 | ± 0.5 | ± 0.8 | ± 1.6 | ± 0.7 |
| ANTWEILER (1952) (EWERBECK) | ± 2.49 | ± 1.75 | | ± 0.29 | ± 1.92 |
| TAYLOR (1949) | ± 2.81 | ± 0.55 | ± 0.96 | ± 1.72 | ± 2.02 |
| RIVA (1953) | ± 4.35 | ± 1.14 | ± 1.28 | ± 1.64 | ± 2.92 |
| VERSCHURE (1954) | ± 2.3 | ± 1.0 | | ± 0.8 | ± 1.4 |
| Eigen waarden | ± 3.11 | ± 0.85 | ± 1.64 | ± 1.15 | ± 2.85 |

De in dit onderzoek gevonden standaarddeviatie van albumine is dus ± 0.3 hoger dan door DOLE (1944) en TAYLOR (1949) werd gevonden; de standaarddeviatie van gamma globuline ligt ook iets hoger.

## *j* EIGEN ONDERZOEK NAAR DE REPRODUCEERBAARHEID EN FOUTENGRENZEN VAN DE METHODE

Voor dit doel werden 26 sera in tweevoud, in verschillende experimenten op verschillende tijden uitgevoerd.
In onderstaande tabel worden de verschillen opgegeven, die hierbij werden gevonden.

*Tabel van de verschillen van 27 in tweevoud uitgevoerde albumine- en van 26 in tweevoud uitgevoerde $\alpha_1$, $\alpha_2$ $\beta$ en $\gamma$ globuline-bepalingen (rel. perc.)*

| No | Albumine | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.6 | 0.3 | 1.1 | 0.5 | 0.4 |
| 2 | 0.9 | 0.1 | 2.1 | 0.4 | 0.7 |
| 3 | 1.4 | 1.7 | 1.5 | 0.8 | 0.8 |
| 4 | 0.0 | 0.9 | 0.8 | 0.1 | 0.2 |
| 5 | 1.8 | 0.2 | 1.6 | 0.6 | 0.6 |
| 6 | 0.0 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 |
| 7 | 1.3 | 0.5 | 0.3 | 0.0 | 0.5 |
| 8 | 0.3 | 0.2 | 0.8 | 0.1 | 1.1 |
| 9 | 2.– | 1.– | 1.– | 1.– | 1.– |
| 10 | 1.3 | 0.3 | 0.3 | 1.– | 0.3 |
| 11 | 1.6 | 0.1 | 2.3 | 0.5 | 1.1 |
| 12 | 0.7 | 0.8 | 1.1 | 1.1 | 1.9 |
| 13 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 |
| 14 | 0.3 | 0.6 | 0.0 | 0.7 | 0.4 |
| 15 | 0.7 | 0.9 | 0.3 | 0.4 | 0.9 |
| 16 | 0.6 | 0.9 | 1.7 | 0.7 | 0.7 |
| 17 | 0.2 | 0.4 | 2.5 | 0.3 | 2.2 |
| 18 | 0.9 | 1.6 | 0.1 | 0.1 | 0.9 |
| 19 | 0.3 | 1.8 | 0.2 | 1.4 | 1.5 |
| 20 | 1.8 | 0.4 | 1.2 | 1.2 | 0.2 |
| 21 | 1.– | 0.1 | 2.6 | 1.6 | 3.1 |
| 22 | 1.5 | 0.2 | 1.6 | 0.1 | 0.4 |
| 23 | 1.4 | 0.5 | 0.9 | 0.0 | 0.0 |
| 24 | 0.4 | 0.0 | 0.5 | 1.– | 0.3 |
| 25 | 0.9 | 0.0 | 0.2 | 1.– | 1.7 |
| 26 | 2.– | 0.0 | 1.3 | 2.– | 1.4 |
| 27 | 0.6 | | | | |
| gemiddelden | 0.9 | 0.55 | 1.– | 0.7 | 0.9 |

Van belang was de gemiddelde fouten van deze duplo bepalingen vast te stellen, ter verkrijging van waarden waarbuiten met een zekere waarschijnlijkheid een

nieuwe waarneming significant afwijkend is van een vorige waarneming bij dezelfde patient.

Voor de berekening hiervan werden twee methoden gevolgd.

I. In de eerste plaats werden de formules van Moore en Lynn toegepast, die boven werden vermeld. Ook hier geldt dat wanneer $K = 2$ wordt gekozen, de overschrijdingskans bij toepassing van deze formules aanzienlijk kleiner dan 1/20 wordt. Berekening van de rekenkundige gemiddelden van de verschillen en de standaarddeviaties etc. van 26 in tweevoud uitgevoerde bepalingen van het relatief percentage van albumine, alpha I, alpha II, beta en gamma globuline.

| | Rekenkundig gemiddelde van de verschillen. N = 26 | Standaard-deviatie | Standaardfout van rekenkundig gemiddelde | Standaard-fout van de standaard-deviatie | Te verwachten grenzen bij een overschrijdingskans van < 1/20 |
|---|---|---|---|---|---|
| Albumine | 0.90 | 0.63 | 0.12 | 0.09 | ± 2.8 |
| Alpha I | 0.55 | 0.52 | 0.10 | 0.07 | ± 2.1 |
| Alpha II | 1.– | 0.79 | 0.16 | 0.11 | ± 3.3 |
| Beta | 0.70 | 0.53 | 0.10 | 0.07 | ± 2.2 |
| Gamma | 0.90 | 0.73 | 0.15 | 0.10 | ± 3.1 |

II. GRASSMANN en HANNIG (1952) bepalen de gemiddelde fout door gebruikmaking van de formule: $s = \sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 / n - m}$

$n$ totaal aantal bepalingen

$m$ aantal onderzochte sera

Deze onderzoekers bepalen de transparant gemaakte papierstroken direct, zonder elueren, colorimetrisch.

Vergelijking van onze gemiddelde fout met de door GRASSMANN en HANNIG gevonden waarden:

| | GRASSMANN en HANNIG (1952) $n = 78$ $m = 25$ | Eigen onderzoek (volgens dezelfde formule) $n = 52$ $m = 26$ |
|---|---|---|
| Albumine | 1.2 | 0.61 |
| Alpha I | 0.6 | 0.51 |
| Alpha II | 0.7 | 0.77 |
| Beta | 0.7 | 0.52 |
| Gamma | 1.2 | 0.73 |

Uit de resultaten van onze in tweevoud uitgevoerde bepalingen meen ik te mogen concluderen dat de reproduceerbaarheid van onze methode goed is en dat onze

methode, waarbij de kleurstof geëlueerd wordt, weliswaar tijdrovend, doch nauwkeurig is.
Een nieuwe waarneming is met een waarschijnlijkheid groter dan 95% afwijkend van een vorige waarneming bij dezelfde patient, indien de verschillen groter zijn dan: 2.8% voor albumine, 2.1% voor alpha I, 3.3% voor alpha II, 2.2% voor beta, 3.1% voor gamma.
Bij gebruikmaking van deze getallen is de kans zeer klein, dat een gevonden verschil op toeval berust.

# II

*a* EIGEN ONDERZOEK TER VERGELIJKING VAN DE KLASSIEKE UITZOUTINGS-METHODE VOLGENS HOWE MET DE ZONE-ELECTROPHORESE

*b* VERGELIJKING VAN DE TISELIUS-ELECTROPHORESE MET DE ZONE-ELECTROPHORESE (8 EIGEN BEPALINGEN)

## *a* ONDERZOEK TER VERGELIJKING VAN DE KLASSIEKE UITZOUTINGS-METHODE VOLGENS HOWE MET DE ZONE-ELECTROPHORESE

Voor de scheiding van de bloedeiwitfracties staan ons verschillende methoden ten dienste:

*a.* uitzoutingsmethode
*b.* alcohol praecipitatie-techniek
*c.* electrophorese
*d.* onderzoek met de ultracentrifuge

Sedert lange tijd is bekend dat albumine en globuline door een half verzadigdt ammoniumsulfaat-oplossing gescheiden kunnen worden. De resultaten zijn beter en constanter indien in plaats van ammoniumsulfaat natriumsulfaat gebruike wordt. De methode van HOWE (1921) gold zeer lang voor dé methode waarbij met nauwkeurig vastgestelde natriumsulfaat-concentraties de globulinen als euglobuline, pseudo globuline I en II neergeslagen werden. Het totale stikstofgehalte van het serum werd bepaald alsook de reststikstof en de stikstof in de afzonderlijke filtraten. Uit het verschil van totaal stikstof enerzijds en albumine-stikstof en reststikstof anderzijds werd het globuline-stikstof berekend. Hierna wordt op eiwit omgerekend. Het in plasma aanwezige fibrinogeen wordt met calciumchloride neergeslagen en van het geïsoleerde fibrine wordt weer het stikstofgehalte vastgesteld, hetgeen ook weer op eiwit wordt omgerekend. Deze techniek was voor lange tijd de enige methode ter bepaling van het eiwitspectrum.

Nadat een nieuwe indeling van de bloedeiwitten in fibrinogeen, $\alpha$, $\beta$ en $\gamma$ globuline en albumine door de electrophorese werd verkregen, werd naar andere methoden van uitzouting gezocht waarbij het mogelijk was fracties te scheiden, die enigszins overeenkwamen met $\alpha$, $\beta$ en $\gamma$ globuline.

MAJOOR (1942 en 1947) slaat de serum-eiwitten neer met natriumsulfaat-oplossingen van 31 verschillende concentraties (van 10–38 % natriumsulfaat) en verkrijgt zo diagrammen, die gelijkenis vertonen met de electrophorese.

TISELIUS (1937) en LUETSCHER (1940) vonden dat $\alpha$ globuline van de electrophorese overeenkwam met pseudo globuline II van HOWE.

Het gamma globuline zou gedeeltelijk euglobuline en gedeeltelijk pseudo globuline I zijn.

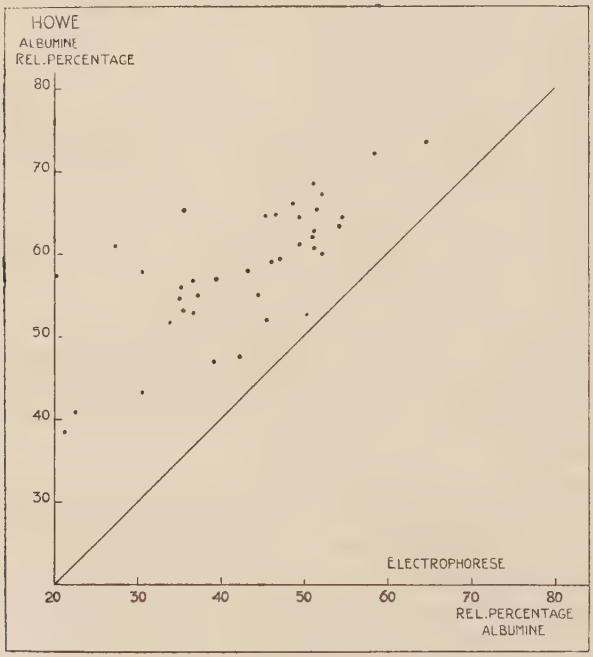
LUETSCHER (1940) dacht aanvankelijk dat het albumine/globuline-quotient volgens HOWE altijd overeenkwam met het albumine/globuline-quotient volgens de electrophorese. Bij nephrose patienten echter was het opgevallen dat hierbij het albumine volgens HOWE aanzienlijk hoger was dan volgens de electrophoresemethode bepaald.

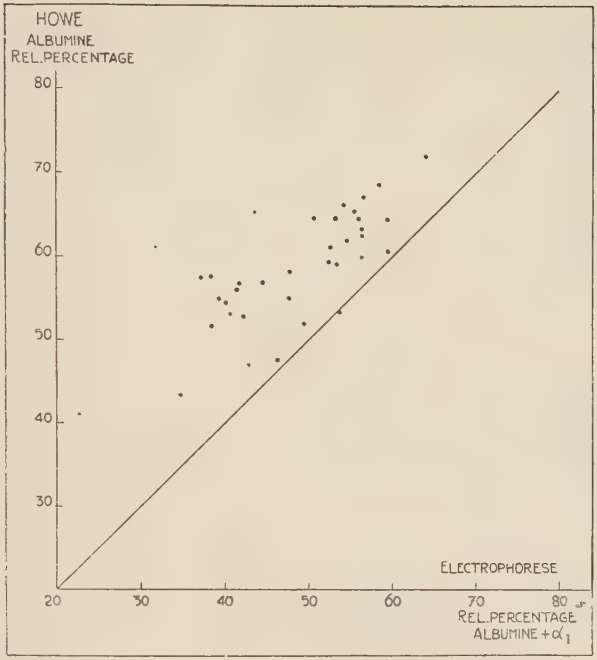
Hoewel het reeds lang vaststaat (MAJOOR 1942) dat met de methode van HOWE een veel te hoge albumine-waarde wordt verkregen, mogen de volgende figuren dienen om dit nogmaals te bevestigen.

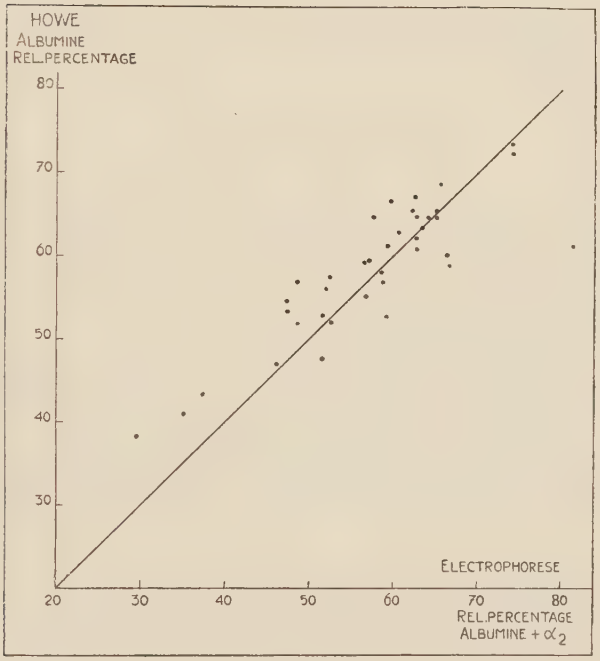
Hiertoe werden 37 sera van patienten lijdende aan rheumatoide arthritis, M. Bechterew en 2 sera van lijders aan een nephrotisch syndroom onderzocht volgens de uitzoutingsmethode enerzijds en de zone-electrophorese anderzijds.

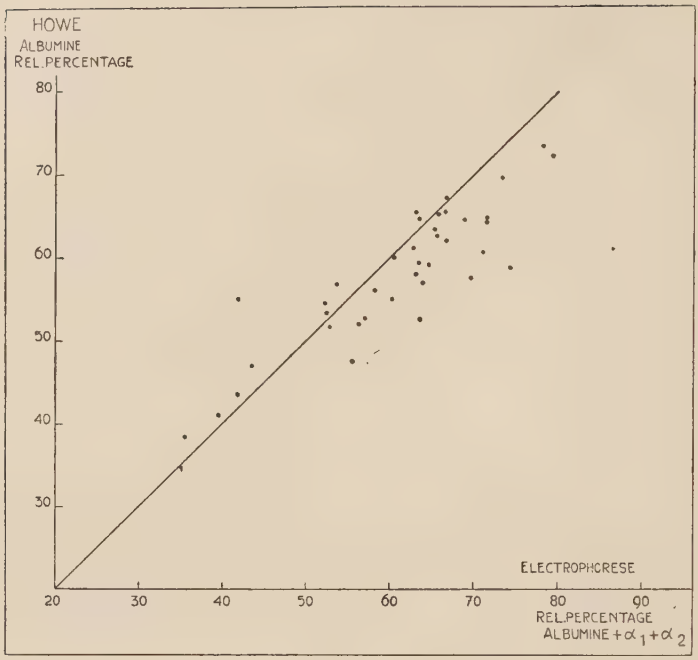
Bij de uitzoutingstechniek werd 22.8% $Na_2SO_4$ gebruikt. De stikstof-bepalingen werden volgens KJELDAHL verricht.
Vergeleken werden de relatieve albumine-percentages verkregen met deze twee methoden en uitgezet in de volgende figuren.
*a.* Relatieve albumine-percentage volgens Howe ten opzichte van relatief albumine volgens electrophorese (pagina 34).
*b.* Relatieve albumine-percentage volgens Howe, ten opzichte van relatief albumine volgens electrophorese, vermeerderd met relatief alpha I globuline (pagina 35),
*c.* Relatieve albumine-percentage volgens Howe, ten opzichte van het relatief albumine volgens electrophorese, vermeerderd met relatief alpha II globuline (pagina 35).
*d.* Relatieve albumine-percentage volgens Howe, ten opzichte van het relatief albumine volgens electrophorese, vermeerderd met relatief alpha I en alpha II globuline (pagina 36).

*Resultaten:*
In alle gevallen werd het relatieve albumine-percentage volgens Howe bepaald, vergeleken met de electrophorese, boven de lijn gevonden.
Bij de twee nephrose-sera met zeer sterk verhoogde alpha II-waarden was het verschil het grootst. Vermeerderen we het electrophorese-albumine met alpha I, dan liggen de punten nog steeds boven de lijn. De beste overeenkomst wordt gevonden als we de relatieve electrophorese-albumine vermeerderen met alpha II globuline. Deze overeenkomst is beter dan vermeerdering met alpha I èn alpha II globuline.




HOWE
ALBUMINE
REL.PERCENTAGE
80
70
60
50
40
30
ELECTROPHORESE
20
30
40
50
60
70
80
REL.PERCENTAGE
ALBUMINE + α1


HOWE
ALBUMINE
REL.PERCENTAGE
80
70
60
50
40
30
ELECTROPHORESE
20
30
40
50
60
70
80
REL.PERCENTAGE
ALBUMINE + α2




Met nadruk wil ik er op wijzen, dat de overeenkomst die gevonden wordt bij vermeerdering van albumine met $\alpha_2$ globuline niet betekent, dat bij de uitzouting volgens Howe, alleen $\alpha_2$ van de globulines in oplossing blijft.

### *b* VERGELIJKING VAN DE TISELIUS-ELECTROPHORESE MET DE ZONE-ELECTROPHORESE

Het is begrijpelijk dat direct in de beginperiode van de papier-electrophorese vele onderzoekers de resultaten getoetst hebben aan de klassieke electrophorese. De papier-electrophorese bleek, op enkele uitzonderingen na, deze toets met glans te doorstaan. Dit is niet vanzelfsprekend, omdat de technieken door het verschil in methode van meting principieel verschillen.
Bij de methode van Tiselius wordt door directe fotographische registratie van de brekingsindex-gradienten der diverse fracties, het bekende diagram verkregen, waaruit door planigraphische metingen van de gebieden onder de toppen een bepaling van de relatieve percentages van het serumeiwit volgt.
Bij de papier-electrophorese komt de meting neer op een kleurstofadsorptie van de diverse fracties. Hieraan werd in het vorige hoofdstuk reeds een korte beschouwing gewijd.
Het is dus te begrijpen dat hieraan consequenties verbonden zijn. Bij de papier-electrophorese worden bij de gebruikelijke kleuringen (amidozwart, azocarmijn of broomphenolblauw) uitsluitend eiwitten gekleurd, dus geen lipoiden. Bij de Tiselius-

electrophorese worden deze lipoiden gebonden aan eiwitten meebepaald. Men kan dus op zuiver theoretische gronden voorspellen dat het globuline, waaraan onder normale omstandigheden de meeste lipoiden gebonden zijn ($\beta$ globuline), bij de papier-electrophorese een lagere waarde zal vertonen dan bij de Tiselius-electrophorese. In mindere mate zou in het normale serum het alpha I percentage bij de papier-electrophorese eveneens een lagere waarde moeten vertonen, daar ook hieraan lipoiden gebonden zijn (COHN 1950).
Worden voor de Tiselius-electrophorese de lipoiden geëxtraheerd uit het serum dan wordt een afname van alpha en vooral van beta globuline geconstateerd (ZELDIS et al. 1945; D. H. MOORE 1949).
OTT et al. (1952) vonden bij vergelijking van beide methoden dat met de papier-electrophorese het beta globuline gemiddeld 5.2% lager lag.
Zoals uit het overzicht op blz. 26 van de normale gemiddelde waarden verkregen met de Tiselius-electrophorese blijkt, wordt er een aanzienlijke discrepantie, vooral in het gamma globuline-percentage gevonden door de diverse onderzoekers. De technieken verschillen hier sterk, hetzij dat verschillende buffers werden gebruikt, hetzij dat van andere serumverdunningen werd uitgegaan.
Men kan zich dus afvragen of het op grond hiervan wel terecht is om de papier-electrophorese met een willekeurige vrije electrophorese te vergelijken.
RIVA en MARTINI (1953) vergeleken de Tiselius-methode met de papiermethode (amidozwart techniek van GRASSMANN, (1950). Als gemiddelde waarden van 30 normale sera met de Tiselius-methode vonden zij vergeleken met 12 sera papier-electrophorese:

| | *Tiselius* | *Papier-electrophorese* | $\frac{\textit{Tiselius}}{\textit{Papier}}$ *verhouding* |
|---|---|---|---|
| Albumine | 63.5 ± 2.32 | 65.2 ± 4.35 | 0.9 |
| Alpha I | 2.– ± 0.52 | 4.1 ± 1.14 | 0.5 |
| Alpha II | 7.3 ± 1.15 | 6.7 ± 1.28 | 1.09 |
| Beta | 11.3 ± 1.40 | 9.8 ± 1.64 | 1.15 |
| Gamma | 15.9 ± 1.6 | 14.1 ± 2.92 | 1.13 |

Bij vergelijking van 28 pathologische sera noteerden zij de volgende gemiddelde verhoudingen (met standaarddeviaties) van de verschillende fracties:

| | $\frac{\text{Tiselius}}{\text{Papier}}$ gemiddelde |
|---|---|
| Albumine | 0.99 ± 0.08 |
| Alpha I | 0.55 ± 0.25 |
| Alpha II | 1.14 ± 0.38 |
| Beta | 1.14 ± 0.23 |
| Gamma | 1.04 ± 0.17 |

Bij drie gevallen van de ziekte van Kahler werden de volgende verhoudingen gevonden van het gamma globuline:

$$\frac{\text{Tiselius}}{\text{Papier}} \quad 1.22;\ 1.25;\ 1.-$$

In de literatuur komen de grootste quantitatieve discrepanties voor bij de ziekte van Kahler (FLYNN en DE MAYO 1951; GRASSMANN en HANNIG 1952; CONN en KLATSKIN 1954). Qualitatief werden nimmer belangrijke verschillen geconstateerd.
De verklaring voor de quantitatieve verschillen werd reeds in het vorige hoofdstuk gegeven (blz. 21).
Aangezien wij het kleurstof-adsorptievermogen van paraproteinen, zoals o. m. bij de ziekte van Kahler, niet kennen, mogen wij de resultaten van kleurstofbinding van het normale gamma globuline niet zonder meer transponeren op een paraproteine.

*Eigen onderzoek ter vergelijking van beide methoden*
Voor dit doel werden drie normale biggensera onderzocht door Dr. Janssen (Staats Veeartsenijkundig Instituut, Amsterdam) met de Tiselius-apparatuur.
Twee myeloom-sera werden onderzocht met de Tiselius-techniek op het laboratorium van de Amstel Brouwerij (Dr. Mastenbroek) en drie sera, waarvan één normaal, werden onderzocht door Dr. Nanninga (laboratorium Prof. Gorter te Leiden).
Resultaten:

| | | *Tiselius-electrophorese* | | | | *Papier-electrophorese* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Alb. | alpha | beta | gamma | Alb. | alpha | beta | gamma |
| *Janssen* | | | | | | | | | |
| biggen sera | *1)* | 38.– | 12.– | 18.– | 32.– | 37.9 | 14.5 | 16.2 | 31.4 |
| | *2)* | 38.2 | 13.1 | 20.4 | 28.3 | 36.8 | 16.– | 17.3 | 29.9 |
| | *3)* | 44.– | 10.2 | 17.1 | 28.7 | 39.4 | 15.– | 16.6 | 29.– |
| *Mastenbroek* | | | | | | | | | |
| ziekte van Kahler | *1)* | 28.9 | 6.1 | 9.3 | 55.7 | 14.1 | 7.7 | 7.2 | 71.– |
| | | | | | | (22.1) | (7.5) | (7.–) | (63.–) |
| | *2)* | 26.3 | 5.4 | 8.3 | 60.– | 17.5 | 4.2 | 6.3 | 72.– |
| | | | | | | (26.–) | (4.–) | (6.–) | (64.–) |
| *Nanninga* | | | I II | | | | I II | | |
| normaal | *1)* | 59.8 | 4.2 10.2 | 15.6 | 10.3 | 59.1 | 4.6 11.2 | 13.5 | 11.6 |
| lupus eryth. dissem. | *2)* | 32.7 | 9.3 21.3 | 15.7 | 21.4 | 32.5 | 5.– 20.9 | 11.6 | 30.– |
| | *3)* | 37.5 | 6.3 14.– | 17.6 | 24.5 | 40.– | 4.3 12.1 | 10.6 | 33.– |

De tussen haakjes geplaatste getallen zijn de waarden die verkregen worden zonder de factor 1.6, waarmee de globuline-fracties anders vermenigvuldigd worden. Hier is de overeenkomst zonder deze factor beter.

De overeenkomst van beide methoden is in grote lijnen opvallend goed, uitgezonderd de twee myeloom sera. Hierbij is zonder gebruik te maken van de globuline-factor 1.6, de gelijkenis duidelijk beter. Aangezien de gemiddelde waarden van de normale sera van Janssen, Mastenbroek en Nanninga met de Tiselius-techniek sterk uiteenlopen door verschil in technieken, zijn conclusies over deze vergelijking niet goed mogelijk .

De mededelingen van RIVA en MARTINI (1953) zijn daarentegen beter bruikbaar voor conclusies, aangezien hier met de twee technieken bij normale sera redelijke overeenkomst werd gevonden.

Voorts zouden we nog kunnen opmerken dat het alpha I bij de papiertechniek beter gescheiden wordt dan bij vele Tiselius-technieken, waar het veelal onder de albumine-top valt. De foutengrenzen behoeven bij de papier-electrophorese zeker niet groter te zijn dan bij de Tiselius-methode (zie ook VERSCHURE 1954); het beta globuline is bij de papier-electrophorese lager, omdat de lipoiden die aan het beta globuline zijn gebonden niet worden meebepaald, en is dus dichter bij de feitelijke toestand; de gemiddelde waarden van normale sera verkregen door verschillende onderzoekers tonen een veel betere overeenkomst bij de papier-electrophorese dan bij de Tiselius-methode.

De papier-electrophorese is voor het klinisch laboratorium de methode der keuze voor klinisch-practische doeleinden.

# III

*a* ALGEMENE BESCHOUWING OVER DE ELECTROPHORETISCHE EIWIT-FRACTIES VAN HET BLOED

*b* DE PRODUCTIE EN HERKOMST VAN ANTILICHAAM-EIWITTEN

*c* DE INVLOED VAN A. C. T. H. EN CORTISON OP DE PRODUCTIE VAN ANTILICHAMEN

## *a* ALGEMENE BESCHOUWING OVER DE ELECTROPHORETISCHE EIWITFRACTIES VAN HET BLOED.

Door de ontwikkeling van nieuwe methoden van onderzoek kwamen de quantitatieve en qualitatieve veranderingen van de bloedeiwitten in de laatste jaren in toenemende mate in het middelpunt van de belangstelling te staan.
WUHRMANN (1947) wees op de met zekere regelmaat terugkerende veranderingen in het bloedeiwit-spectrum bij groepen van diverse ziektetoestanden. Aan de hand hiervan kwam hij tot de onderscheiding van de volgende typen:
*a.* type van de acute ontsteking
*b.* type van de subacuut chronische ontsteking
*c.* type van de diffuse leverparenchym-beschadiging
*d.* type van het nephrotisch syndroom.
*e.* verschillende plasmocytoom typen.
Onder dysproteinaemiën worden bloedeiwit-veranderingen verstaan van quantitatieve aard, hypo- en hyperproteinaemie, hyperfibrinogenaemie, hypergammaglobulinaemie e.a.
Bij een paraproteinaemie (WUHRMANN, 1949*b*) worden daarentegen pathologische eiwitlichamen gevonden die zich door hun chemisch-physische eigenschappen onderscheiden van de normale eiwitfracties. Het plasmocytoom is de meest bekende representant van deze groep. Ook bij de KalaAzar, lymphogranuloma inguinale, de ziekte van Besnier Boeck, lever-cirrhose, nephrose, subacute endocarditis, chronische arthritiden worden – in niet alle gevallen, maar een enkele maal – deze paraproteinen ook gevonden.
Het abnormale chemisch-physische karakter van deze paraproteinen, waardoor ze zich onderscheiden van de normale eiwitfracties, kwam door electrophoretisch onderzoek, maar bovenal door ultracentrifuge onderzoek aan het licht. Door het ultracentrifuge onderzoek (SVEDBERG 1940) kunnen de moleculairgewichten worden berekend uit de sedimentatie constante, als andere factoren zoals b.v. de diffusie constante bekend zijn.
Zo vonden PEDERSEN (1947) en WALDENSTRÖM (1944, 1948, 1949) globulines met een sedimentatie constante van 19 tot 20 S, overeenkomende met een moleculairgewicht van ongeveer 1 millioen, bij ziekten die gekenmerkt zijn door een min of meer scherp omlijnd clinisch beeld: de makro-globulinaemie of purpura macro globulinaemica (WALDENSTRÖM 1949).
Kryoglobulines zijn eiwitstoffen die in de koude neerslaan en gelificeren (LERNER 1946, 1947).
LERNER et al. (1947) beschreven een geval van purpura en hyperglobulinaemie waarbij in het plasma grote hoeveelheden van een in de koude neerslaande globuline werden gevonden, die volgens physisch chemische karakterisering zich als een abnormaal gamma globuline gedroeg.

*Algemene beschouwing over de eiwitfracties van het normale menselijke plasma.*

I *Albumine*

Albumine is de grootste fractie van de menselijke plasma-eiwitten.

Albumine heeft een moleculair gewicht van 70.000; de lengte is ongeveer 150 Å, de breedte ongeveer 38 Å. Het albumine heeft een grote negatieve lading bij de *pH* van het bloed waardoor het albumine een belangrijke rol heeft bij het vasthouden van vocht in de bloedbaan. De viscositeit van albumine is gering. Door de kleine molecuul-grootte is de totale oppervlakte van albumine zeer groot, waardoor het in staat is een groot aantal stoffen te transporteren.

Albumine bindt zeer verschillende stoffen: anionen van vetzuren, aromatische carboxylzuren, aminozuren, sulfonamiden, galkleurstoffen, vitaminen *C*, *K* en *P*, vele pharmaca en antibiotica (EDSALL 1947. GOLDSTEIN 1949. BENNHOLD 1950).

De plasma-eiwitten hebben normaal een colloid-osmotische druk van 25 mm Hg; het grootste aandeel hierin komt op rekening van albumine, 1 gram albumine per 100 ml geeft een osmotische druk van 6 mm Hg, 1 gram globuline per 100 ml daarentegen geeft een osmotische druk van 1.5 mm Hg (WRIGHT 1947). De plasma-eiwitten dragen slechts weinig bij (minder dan een tiende deel) tot de bufferwerking van het bloed.

KEKWICK (1948) toonde aan dat de albuminen weliswaar een zelfde moleculairgewicht hebben, echter toch geen homogene stoffen zijn. Het bestaat uit twee fracties waarvan het chemische onderscheid bestaat in kristalliseerbaarheid en koolhydraatgehalte.

LUETSCHER (1939) vond dat bij electrophorese bij een *pH* 4.0 het albumine in 2 fracties was te scheiden ($\alpha$ fractie 67%, $\beta$ fractie 33%).

II *en* III *Alpha en beta globuline*

zijn zeer inhomogene stoffen, zoals uit het verschil in moleculairgewichten reeds blijkt:

EDSALL (1947) en PEDERSEN (1945)

| | | | |
|---|---|---|---|
| $\alpha$ I globuline | 90.000 | $\alpha$ I lipoproteine | 200.000 |
| $\alpha$ II globuline | 300.000 | | |
| $\beta$ I globuline | 90.000 | $\beta$ I lipoproteine | 1.300.000 |
| $\beta$ II globuline | 150.000 | | |

Het alpha en beta proteine zijn de dragers van ongeveer 75% van de plasma-lipoiden (BLIX et al. 1941, ONCLEY et al. 1950).

Op grond van ultracentrifuge onderzoekingen komen JONES et al. (1951) tot de opvatting dat de voornaamste lipoiden van het bloed, inclusief glyceryl-esters, cholesterol, cholesterolesters, phospholipoiden en vetzuren getransporteerd worden in de vorm van zeer grote lipoproteine moleculen van verschillende typen.

RUSS et al. (1951) vonden de cholesterol-phospholipoid verhouding van $\alpha$ lipoproteine bij normale mensen variërend van 0.42 – 0.62, terwijl deze verhouding in de $\beta$ lipoproteinefractie ten gunste van het cholesterol uitviel, variërend van 1.10 - 1.53.

Bij een groep vrouwen (18–35 jr.) vonden RUSS et al. (1951) meer $\alpha$ en minder $\beta$ lipoproteine dan bij een groep mannen van dezelfde leeftijdsgroep.
HEYDEMANN (1954) deelt mede ditzelfde verschil gevonden te hebben met zijn techniek van uitzouting van lipoproteinen met geconcentreerde natriumsulfaat-oplossingen. HEYDEMANN (1953) bepaalt de cholesterol en lipoidphosphor die in oplossing blijft bij uitzouting met stijgende natriumsulfaatconcentraties en verkrijgt zo een indruk over het gedrag van de lipoproteinen bij de natriumsulfaat-uitzouting volgens MAJOOR (1942). Zie ook MAJOOR en HEYDEMANN (1954).
Aan $\beta$ I globuline worden de metalen ijzer (SCHADE 1946) en koper (GOLDSTEIN 1949) gebonden. Eén molecule $\beta$ I globuline bindt 2 moleculen ijzer. SURGENOR (1948) vond dat aan 1 mg $\beta$ I globuline 0.38 – 1.25 $\gamma$ $Fe^{++}$ kan worden gebonden. Dit bindingsvermogen is slechts voor één derde deel verzadigd (HOLMBERG 1945). De fractie is voorts van betekenis voor de bloedstolling daar het grootste deel van het prothrombine in de $\beta$ fractie gevonden wordt (EDSALL 1947), terwijl de rest in het $\alpha$ en $\gamma$ globuline gevonden is.
Een derde deel van de isohaemo-agglutininen werd in de $\beta$ fractie gevonden (COHN 1947), tweederde deel in de $\gamma$ fractie. COHN vond eveneens één anti *Rh* factor in de $\beta$ fractie.
Een eiwit met aparte plaats is het 'acute-phase-proteine' of 'C reactive protein'. Door het effect van dit eiwit op de zwelling van pneumococcen kapsels wordt het ook wel genoemd: 'non specific capsular swelling substance' (LÖFSTRÖM 1939, 1942, 1943 en 1944).
Het kan bij verschillende acute ziekteprocessen gevonden worden.
Dit eiwit wordt echter ook gevonden in het serum na injectie met colloidaal zwavel. Het is dus aspecifiek. Electrophoretisch is het een alpha I globuline (PERLMANN et al. 1943, HEDLUND 1947).
In het alpha en beta globuline worden tevens koolhydraten gevonden (glycoproteinen)
Haptoglobine is een koolhydraat houdend $\alpha_2$ globuline dat in staat is om het peroxydase vermogen van haemoglobine te activeren (POLONOVSKI 1939; van ROYEN 1950).
GILLARD (1947) vermeldt toename van deze haptoglobine in de sera van patienten lijdende aan pneumonie, pleuritiden, tuberculosis, verschillende rheumatische ziekten, ontstekingen in het algemeen en maligne tumoren als ze vergezeld gaan van infectie.
Op grond van het feit dat bij bijna dezelfde ziekten een vermeerderde hoeveelheid haptoglobine als acute-phase-proteine wordt gevonden (pneumonie, tuberculosis, acuut rheuma, rheumatoide arthritis, peritonitis e.a.) is wel gesuggereerd dat deze beide stoffen identiek zouden zijn. Het is echter vast komen te staan dat het acute-phase-proteine een $\alpha_1$ globuline is (PERLMANN et al. 1943) en het haptoglobine een $\alpha_2$ globuline is (van ROYEN 1951).
BLIX et al. (1941) vonden reeds dat alpha globuline sterk koolhydraathoudend was. SEIBERT (1943 en 1947) vond een toename van het serumkoolhydraatgehalte bij tuberculosis, welke toename gepaard ging met toename van $\alpha_2$ globuline.

IV *Gamma globuline*

Ook het gamma globuline is een inhomogeen eiwit, zoals reeds door TISELIUS (1937b) werd vastgesteld. Steeds wordt in een normaal serum bij de Tiselius-electrophorese een brede gamma top gevonden, er op wijzende dat gamma globuline bestaat uit stoffen die verschillende iso-electrische punten hebben. JAGER et al. (1948) isoleerden twee gamma componenten met iso-electrische punten bij *pH.* 7.3 resp 6.85. Ook deze twee fracties gedragen zich electrophoretisch niet als symmetrische toppen, zodat zij meenden dat ook deze twee fracties nog inhomogeen waren. Ook door ultracentrifuge onderzoek trad bij hen deze inhomogeniteit aan het licht. De verschillende moleculairgewichten zijn 156.000 en 300.000 (EDSALL 1947). Het gamma globulinemolecuul is langgerekt, lengte 235 Å en breedte 44 Å (PEDERSEN 1945).

Op grond van de studie met electronen-microscopie komt MITCHELL (1952) tot ongeveer dezelfde waarden, 250 Å resp. 50 Å.

Wat de biologische functie betreft is, zoals algemeen reeds bekend is, het gamma globuline uit immunologisch oogpunt de voornaamste eiwitfractie. In de gamma fractie bevindt zich 98% der antilichamen (COHN 1948).

Er mag op gewezen worden dat in de gamma fractie ook andere eiwitstoffen dan antilichamen aanwezig zijn. Over de productie en herkomst van antilichaam gamma globuline moge verwezen worden naar het volgende hoofdstuk.

V *Fibrinogeen*

Het fibrinogeen is een sterk langgerekt molecuul (700 Å lang en 38 Å breed). Het moleculairgewicht is zeer hoog, 400.000 – 500.000 (EDSALL 1947; PEDERSEN 1945).

Door de electrophorese is onze kennis van het fibrinogeen niet verrijkt. Bij de Tiselius-electrophorese loopt het tussen $\beta$ en $\gamma$ globuline in.

Bij de papier-electrophorese wordt fibrinogeen gevonden tussen beta en gamma globuline, echter gedeeltelijk op het gebied van het gamma globuline, zodat de bepaling niet mogelijk is volgens de ons ten dienste staande technieken van papier-electrophorese. Derhalve moet bij deze papier-electrophorese worden uitgegaan van serum.

*De biosynthese van de plasma eiwitten*

Het mechanisme van de biosynthese van eiwitten heeft lange tijd vele onderzoekers gefascineerd. De technische moeilijkheden van de isolatie en karakterisering van de eiwitten hebben de vooruitgang in onze inzichten lange tijd onmogelijk gemaakt. Experimenten met isotopentechnieken hebben tot hernieuwde belangstelling in deze problemen geleid.

De oudere onderzoekingen kwamen tot de conclusie dat albumine en fibrinogeen uitsluitend in de lever gesynthetiseerd worden (JÜRGENS en GEBHARDT 1934, MADDEN en WHIPPLE 1940, WHIPPLE 1941, WHIPPLE en MADDEN 1944) Doch ook bij de synthese van antilichaam-gamma globuline zou de lever een rol spelen (CRAMPTON en HAUROWITZ (1950). Bij gehepatectomeerde honden

konden TARVER en REINHARDT (1947) aantonen door met radio-actief zwavel gemerkt methionine, dat ook in de weefsels buiten de lever plasma-globuline gesynthetiseerd wordt.
Doorstromingsexperimenten van geïsoleerde levers met $^{14}C$ lysine hebben MILLER et al. (1951) tot de conclusie geleid, dat in de lever behalve alle albumine en fibrinogeen, ook 80% van het globuline gesynthetiseerd kan worden. De lever zou per dag circa 9% levereiwit en circa 25% van de circulerende plasma-eiwitten synthetiseren.
Aan de productie en herkomst van antilichaameiwitten wordt in het volgende hoofdstuk een beschouwing gewijd.

### *b* DE PRODUCTIE EN HERKOMST VAN ANTILICHAAMEIWITTEN

Men mag aannemen dat bij enkele ziekten de toename van het serumglobuline, althans gedeeltelijk, kan voortkomen uit antilichaamproductie op onbekende antigenen.
Over de wijze en plaats van vorming van antilichamen is ons nog weinig met zekerheid bekend.
In 1939 deed SABIN haar macrophagentheorie het licht zien. Dezelfde cellen phagocyteren een antigeen en produceren het antilichaam (SABIN 1939). Tevoren maakten MC MASTER en HUDACK bekend dat de lymphklieren antilichamen maken (MC MASTER 1935). BURNET (1938), EHRICH (1942), DOUGHERTY (1944 *a* en *b*), HARRIS (1945) en OAKLEY (1949) kwamen tot dezelfde conclusie. HARRIS, GRIMM, MERTENS en EHRICH (1945) vonden dat lymphocyten die uit een lymphklier stroomden meer antilichamen bevatten dan het omgevende plasma. WHITE en DOUGHERTY (1945) meenden in een experimentele studie aangetoond te hebben, dat lymphocyten antilichamen maken onder contrôle van de bijnierschorshormonen, en wel de koolhydraatstofwisseling regulerende bijnierschorshormonen; de antilichamen zouden ontstaan door desintergratie van lymphocyten in het lymphoide-weefsel.
CHASE (1951) transplanteerde weefsels van een geïmmuniseerd dier en kon zo het vermogen om antilichamen te maken overbrengen bij de nieuwe gastheer. Cellen van milt of lymphklieren van gesensibiliseerde caviae gaven aanleiding tot sensibilisatie van dieren naar welke de cellen waren overgebracht.
HARRIS et al. (1954) deden het volgende onderzoek. Na bacteriën en virussoorten in de achterpoot van een konijn te hebben geïnjiceerd werd de regionaire lymphklier uit de fossa poplitea geëxcideerd en de lymphocyten werden geïsoleerd en gewassen, waarna ze bij normale konijnen intraveneus werden ingespoten. In de bloedbaan van deze konijnen werden de specifieke antilichamen gevonden tegen de bovengenoemde bacteriën en virussoorten. Dit kon niet verklaard worden door passieve overdracht van antilichamen, noch door overdracht van het antigeen zelf. Wanneer de cellen beschadigd worden door bevriezing, verhitting, ultravioletbestraling of door lysis dan ging het antilichaam producerend vermogen bij de ontvanger verloren. Herhaald wassen had geen effect. Na het geven van cortison aan

de donor-konijnen bevatten de lymphklieren minder cellen, echter de cellen die er waren, maakten evenveel antilichamen als die van onbehandelde dieren.
De cellen die vier dagen na de immunisatie werden verkregen waren even productief als ze overgebracht werden op met cortison behandelde dieren als op normale onbehandelde dieren. De cellen echter die twee dagen na de immunisatie waren overgebracht waren minder productief, wat betreft antilichaamproductie, in de groep van met cortison behandelde ontvangers. Dit zou er op wijzen dat de antilichaam-vorming nog incompleet was twee dagen na immunisatie en dat cortison bij deze ontwikkeling tussenbeide komt.
Door deze proeven gaat de opvatting terrein winnen dat de lymphocyten uit lymphklieren antilichamen maken en dat dit mechanisme doorwerkt, wanneer de cellen worden overgebracht bij een andere gastheer. De lymphocyten uit de thymus zouden bij de productie van antilichamen geen rol spelen (HARRIS 1948 en ABRAMS 1949).
De resultaten van WHITE en DOUGHERTY (1945), die wezen op een controlerende functie van de bijnierschors bij de vorming van antilichamen door lymphocyten, werden niet bevestigd door EISEN et al. (1947), THATCHER (1948) en FISCHEL (1949). Evenmin werd door bijnierschors-prikkeling met corticotrophine, zoals door WHITE en DOUGHERTY (1945) was gesuggereerd dat onder invloed van *A. C. T. H.* antilichamen vrijkomen uit lymphocyten, bij de mens een toename van antilichamentiters gevonden door FORSHAM et al. (1948), HERBERT et al. (1949) en SAYERS et al. (1949).
Een ander argument – weliswaar minder krachtig – tegen de opvatting van WHITE en DOUGHERTY was, dat door het opwekken van lymphocytolysis door middel van röntgenbestraling geen toename van antilichaamtiters kon worden geconstateerd door CRADDOCK (1948), TALIAFERRO (1949) en MARSHALL (1950). Nu is door de recente onderzoekingen van de groep van HARRIS (1954) de rol van de lymphocyt in de antilichamenproductie niet te miskennen.
Hiernaast komen vele onderzoekers voor, die aandacht hebben besteed aan de relatie tussen plasmacellen en globuline-antilichamen-productie. Dit zijn in hoofdzaak Scandinaviërs. BING en PLUM (1937) en FAGRAEUS (1948) toonden aan dat ziekten, waarbij hyperglobulinaemie optreedt, gepaard gaan met proliferatie van plasmacellen en andere cellen van het reticulo endotheliale systeem.
BJORNEBOE en GORMSEN (1943) immuniseerden ratten met polyvalent vaccin en zij constateerden een paralleliteit tussen de antilichaamproductie en massieve plasmacel proliferatie. In 1938 had KOLOUCK iets dergelijks waargenomen. FAGRAEUS (1948) toonde antilichamenproductie aan in weefselcultures van een geïmmuniseerde konijnenmilt. Zij vond de grootste antilichamenproductie daar waar de plasmacellenconcentratie het grootst was. De onrijpe plasmacel zou beschouwd moeten worden als de morphologische manifestatie van een reticulumcel op zijn hoogtepunt van antilichamenproductie.
Haar resultaten werden bevestigd door KEUNING en VAN DER SLIKKE (1950) en MARSHALL en WHITE (1950).
Cytochemisch is aangetoond dat plasmacellen de carakteristica vertonen van eiwit-

producerende cellen door THORELL en WISING (1944) door BING et al. (1945), door MOESCHLIN et al. (1951) en MOESCHLIN (1952).
De antilichamen komen vooral voor in de gamma globuline-fractie (TISELIUS 1939 en NEWELL et al. 1939). Welk percentage van het gamma globuline uit antilichaam bestaat is niet met zekerheid bekend (CANNON 1945).
Uit het bovenstaande is het duidelijk dat er een discrepantie bestaat in de opvattingen over het mechanisme van de antilichamenproductie. Enerzijds zijn er krachtige argumenten voor de lymphocyt, anderzijds voor de plasmacel als plaats voor vorming van het antilichaam.
Zoals wel meer voorkomt bij biologische verschijnselen is het zeer goed denkbaar dat het vermogen om antilichamen te produceren niet aan één bepaalde celsoort gebonden is, maar dat zowel lymphocyten, plasmacellen en misschien nog wel andere cellen in staat zijn antilichamen te produceren.
Daar sinds enkele jaren ons voor experimentele doeleinden het cortison en corticotrophine ter beschikking staan en daar van deze stoffen bekend is geworden, dat de verhoging van het serumglobuline, zoals bij vele ziekten kan worden waargenomen, doorgaans tijdens de toediening van cortison en corticotrophine naar beneden gaat en normaliseert, is het op deze plaats noodzakelijk in verband met het effect van deze stoffen op de antilichaamproductie een overzicht te geven van de onderzoekingen op dit gebied.

### *c* DE INVLOED VAN *A. C. T. H.* EN CORTISON OP DE PRODUCTIE VAN ANTILICHAMEN

Het verband tussen de bijnier en antilichaamproductie is reeds vele jaren een onderwerp van studie geweest.
Het effect van adrenalectomie op de antilichaamtiters werd bestudeerd. TAKÉ (1923), JAFFE (1924) en MURPHY (1947) vonden een vermeerdering, PERLA (1928) vond een vermindering en HEKTOEN (1915), KHORAZO (1931), EISEN (1947) en THATCHER (1948) vonden geen verandering in de titers van de antilichamen.
Zo werden ook door invloed van bijnierschors-extracten en na 1949 van *A. C. T. H.* of cortison, geen uniforme veranderingen in de antilichaamspiegels gevonden. DOUGHERTY (1944 *a* en *b*, 1945), MURPHY (1947), en HAMMOND (1950) vonden een vermeerdering; DE VRIES (1950), BJORNEBOE (1951 *a*, 1951 *b*) en GERMUTH (1950, 1951) vonden een afname; THATCHER (1948), FISCHEL (1949), VOLLMER (1949) en OSGOOD (1951) vonden geen verandering onder invloed van deze hormonen in het dierexperiment.
Waarnemingen over de invloed van deze hormonen op de antilichaamspiegels bij de mens zijn beschreven door HERBERT (1949), SAYERS (1949), SAUNDERS (1950), HAHN (1951), LARSON (1951) en MIRICK (1951).
Door deze onderzoekers werden geen veranderingen van de spiegels gevonden. FINLAND (1950) vond bij lijders aan pneumonie, die met *A. C. T. H.* werden behandeld, stijging van titers van bepaalde antilichamen.

Dat de uitkomsten van deze onderzoekers zeer uiteenlopen vindt zijn verklaring in hoofdzaak door verschil in werkwijze en techniek. SCHAAP (1952) deelt in een samenvattend overzicht in het Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde over dit probleem het volgende mee: 'Op gezag van CHASE, WHITE en DOUGHERTY (1946) werd aanvankelijk aangenomen dat bijnierschors-extracten aanleiding gaven tot een verhoogde productie van antistoffen en daardoor de weerstand tegen infecties verhoogden (VOLLMER 1951). Door andere onderzoekers (EISEN 1947, FISCHEL 1949 en MILNE 1949) kon de door CHASE e.a. beschreven titerstijging niet worden gereproduceerd. De uitkomsten van de latere onderzoekers lopen nogal uiteen; de verschillen blijken echter voornamelijk te worden veroorzaakt door verschil in werkwijze. Zij die werkten met de gebruikelijke serologische techniek van agglutinatie en complementbindingsreactie, konden geen invloed van *A. C. T. H.* of cortison op de antistof-titer vaststellen (FINLAND 1950, KASS 1950, MIRICK 1950, ABERNATHY 1951, HAHN 1951, OSGOOD 1951 en SMADEL 1951). Gemeten naar de hoeveelheid gamma globuline bleek bij lijders aan tuberculose, rheumatoide arthritis, lupus erythematodes, sclerodermie (BAEHR 1950, FERSCHING 1950, MIRICK 1950, REINER 1950, VAUGHAN 1950 en 1951) en bij hyperimmune dieren (CREDITOR 1950) een daling het gevolg van de hormoontherapie te zijn. Bij gezonde mensen en bij op gewone wijze geïmmuniseerde dieren werd de daling niet vastgesteld (MILNE 1949 en SAYERS 1949). Werkend met een quantitatieve praecipitatie-techniek, waarbij de antistof-titer wordt uitgedrukt in de hoeveelheid gepraecipiteerde antistofstikstof per ml serum, namen andere onderzoekers (FISCHEL 1950, GERMUTH 1950, DE VRIES 1950, BJORNEBOE 1951*a* en GERMUTH 1951) bij proefdieren een meer of minder duidelijke daling van de titer waar. Ter verklaring van de wel zeer afwijkende uitkomsten van CHASE e.a. opperen FISCHEL, LEMAY en KABAT (1949) de mogelijkheid, dat de gangbare serologische techniek zo grof is, dat bij niet gelijktijdig verrichte bepalingen grote verschillen mogelijk zijn.

LARSON en TOMLINSON (1951), ook werkend met de quantitatieve praecipitatie-techniek konden geen invloed van cortison op de productie van afweerstof bij mensen aantonen (5 patienten met bijnierinsufficiëntie toonden geen remming van het antistofvormende vermogen; 8 patienten met onbehandelde rheumatoide arthritis en 9 patienten, die met cortison werden behandeld, vertoonden een gelijke antilichaamreactie; 2 patienten met rheumatoide arthritis die te voren verhoogde antilichaamtiters hadden, vertoonden noch na kortdurende noch na langdurige behandeling met cortison een verandering in de titers).

GERMUTH en OTTINGER (1950, 1951) toonden bij konijnen aan, dat onderdrukking van de locale actieve anaphylaxie (Arthus-reactie) door cortison steeds gepaard ging met een daling van de hoeveelheid antilichaamstikstof per ml serum. Werd met de behandeling met cortison begonnen na de sensibilisatie dan was er een steile daling van het circulerende antilichaam. Wanneer de antilichaamconcentratie reeds zeer hoog was bij het begin van de cortisonbehandeling, zodat bij het staken van de cortison de antilichaamconcentratie nog hoog genoeg was, dan werd de Arthus-reactie niet beïnvloed.

Op passieve immuniteit hebben *A. C. T. H.* en cortison geen invloed; de daling van de hoeveelheid antilichaamstikstof per ml serum van passief geïmmuniseerde konijnen gaat bij onbehandelde dieren met dezelfde snelheid als bij de met cortison behandelde (FISCHEL 1951).
Ook de passieve anaphylactische reactie bij konijnen (FISCHEL 1950, GERMUTH 1950, 1951) en bij mensen (STOLLERMAN 1951) onderging geen wijziging door hormoontoediening. Hieruit en uit hetgeen GERMUTH en OTTINGER hebben waargenomen bij de passieve Arthus-reactie, mag men de gevolgtrekking maken dat de antigeen-antilichaamreactie door *A. C. T. H.* of cortison niet beïnvloed wordt.'
Door bovengenoemde waarnemingen is er dus een neiging aan te nemen dat door *A. C. T. H.* en cortison wel de vorming van antilichamen geremd kan worden. Dit vindt ook steun in het werk van BJORNEBOE (1951). Deze onderzoeker heeft een gestandaardiseerde methode voor het verwekken van hyperglobulinaemie bij konijnen met een polyvalent pneumococcen vaccin en toonde zowel chemisch als serologisch aan, dat de vorming van antilichamen zowel met *A. C. T. H.* als met cortison kan worden onderdrukt.
Deze opvatting die door het werk van GERMUTH en OTTINGER vastere vorm heeft verkregen, werd op een andere wijze door OVERMAN en HANAN (1953) bevestigd in een experiment met een virusantigeen. Zij gebruikten hiervoor een bofvaccin en spoten hiermee 12 mannelijke konijnen in op dag 0, 7 en 14. Bij 6 konijnen werd te beginnen 3 dagen voor de immunisatie tot en met 6 dagen na de immunisatie dagelijks 4 mg cortison intramuscul. ingespoten. In de cortisongroep waren de antistoftiters duidelijk lager dan in de contrôlegroep.
Op het congres in Zürich (1951) waar een symposion werd gehouden over de invloed van de hypophyse en bijnierschors op biologische reacties, is over bovengenoemde discrepanties nader gediscussieerd. DOUGHERTY heeft aldaar zijn opvattingen gedeeltelijk moeten terugnemen en verklaart mee te gaan met de opinie van GERMUTH, OTTINGER en BJORNEBOE.
BJORNEBOE (1951*b*) deelt in dit symposion mede dat de discrepanties kunnen worden verklaard door de verschillende methoden voor antilichaambepaling die door de diverse onderzoekers werden gebruikt. BJORNEBOE gebruikt de quantitatieve chemische methode voor de antilichaambepaling, die volgens hem superieur is aan de klassieke titratie-techniek, die een grote experimentele fout heeft.
DOUGHERTY geeft zich echter nog niet geheel gewonnen: 'It seems that the question as to whether *A. C. T. H.* and cortisone are capable of elevating the amount of circulating antibody is still open to further investigation. The published data at present tend to militate against the view that these homones produce an anamnestic response. However, a sufficient amount of evidence supporting our original suggestion would indicate that this process is exceedingly complex and that possibly depending upon the type of hormone used, the duration of immunity and the time after application of hormone, it may be found that both points of view may be partially correct'.

# IV

*a* KORT OVERZICHT VAN DE ELECTROPHORETISCHE SERUMEIWIT-FRACTIES BIJ VERSCHILLENDE INTERNE ZIEKTEN EN DIEREXPERIMENTEN

*b* EIGEN ONDERZOEK VAN SERA VAN PATIENTEN LIJDENDE AAN DE ZIEKTEBEELDEN SUB I TOT EN MET SUB VIII

## *a* OVERZICHT VAN DE ELECTROPHORETISCHE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ VERSCHILLENDE INTERNE ZIEKTEN.

Mede aan de hand van de indeling van WUHRMANN (1947), zie blz. 43, worden de electrophoretische veranderingen van de volgende ziektegroepen in het kort meegedeeld.

I Acute ziekteprocessen van infectieuze aetiologie
II Chronische infectieuze processen: tuberculose
III Leverziekten: hepatitis en cirrhose
IV Nierziekten: nephrotisch syndroom en nephritis
V Endocrine ziekten
VI Bloedziekten en reticulosen
VII Plasmocytoom, ziekte van Kahler. Kala Azar
VIII Neoplasmata
IX Ondervoeding
X Dierexperimenten. Aspecificiteit van de veranderingen

I *Acute ziekteprocessen van infectieuze aetiologie*

Bij vele ziekten, vooral van acute infectieuze aetiologie, wordt een afname van het totaal eiwit- en albuminegehalte gevonden, met een toename van het alpha globuline in het serum gepaard gaande.

Deze veranderingen worden onder meer gevonden bij: malaria (DOLE 1945 en TAYLOR 1949), pneumonie (LONGSWORTH 1939, BLIX 1939, LUETSCHER 1941 en WIEDEMANN 1946), subacute bacteriële endocarditis (CARDON 1947 en DONZELOT 1949 *a*, *b*), streptococcen infecties en scarlatina (DOLE 1945) en bij typhus abdominalis (BENHAMOU 1947, 1948)

Deze veranderingen zijn bij deze ziekten in wezen gelijk.

II *Chronische infectieuze processen: tuberculose*

Bij chronische infectieuze processen wordt een vermindering van het albumine en verhoging van alpha en gamma globuline en fibrinogeen gevonden. De eerste onderzoekingen bij tuberculose zijn van LUETSCHER (1941).

SEIBERT (1942, 1943, 1947) vond deze veranderingen van albumine en gamma globuline regelmatig. Het albumine is reeds bij het begin van de ziekte verlaagd; het gamma globuline is ook bij geringe activiteit van de tuberculose vermeerderd; bij verder voortgeschreden gevallen wordt ook het alpha globuline vermeerderd gevonden.

SEIBERT (1947) vond dat er een correlatie bestaat tussen het polysaccharidengehalte en het alpha II globuline in het serum. De vermeerdering van polysacchariden zou een gevolg zijn van een vermeerderde weefselafbraak, waarvoor het hoge ribosegehalte zou pleiten, dat afkomstig is van de nucleinezuren.

VIGLIANI (1950 *a* en *b*) vond dat bij silicotuberculose een verhoogd alpha globuline een teken was van activiteit van de tuberculose, terwijl de silicosis alleen een verhoging van de gamma globuline veroorzaakt.

Uit de literatuur krijgt men de indruk dat bij exsudatieve vormen van tuberculose vooral het alpha globuline en bij productieve vormen meer het gamma globuline toeneemt.
MALMROS en BLIX (1946) vonden bij subacute en chronische infecties zonder uitzondering een verhoging van het gamma globuline. In de meeste gevallen was tevens het alpha globuline verhoogd, terwijl het beta globuline steeds normaal was. De albuminen waren doorgaans te laag, terwijl het totale eiwit vaak aan de hoge kant was.

III *Leverziekten: hepatitis en cirrhose*
Ook bij leverziekten worden, zoals reeds lang bekend is, sterke afwijkingen gevonden bij electrophorese van het bloedplasma.
Bij de hepatitis infectiosa vonden GRAY en BARRON (1943) bij vijf patienten, vijfmaal een verlaagd albumine, viermaal een verhoogd gamma, tweemaal een toename van beta en éénmaal van alpha globuline. KABAT et al. (1943) vonden bij twee patienten alleen een verhoogd gamma globuline. MARTIN (1946) vond bij alle elf onderzochte hepatitis-patienten een verlaagd albumine en verhoogd gamma globuline.
STAUB (1947) onderzocht 101 gevallen; hij meent dat bij benigne vormen het albumine slechts weinig verlaagd is, het alpha vaak, het beta en gamma globuline regelmatig verhoogd zijn. Bij de slecht verlopende gevallen zou de verhoging van de alpha en beta fracties ontbreken. Bij deze gevallen vond hij een aparte top tussen de beta en gamma toppen. Het gamma globuline vertoonde bij deze twee groepen geen verschil. RICKETTS en STERLING (1949 *a*) konden bij vijf licht en bij vijf ernstig verlopende gevallen de bevindingen van STAUB niet bevestigen.
HARTMANN en STEINEBACH (1950 *b*) onderzochten 130 gevallen van hepatitis. Zij vonden ook verlaagd albumine en verhoogd gamma globuline. Het beta globuline was vooral in de reconvalescente periode verhoogd, terwijl het alpha globuline doorgaans aan de lage kant werd gevonden. Daarentegen vond de groep van WUHRMANN (1950) een vermeerderd beta globuline in beginstadia van hepatitis. OLHAGEN (1947 *a*) en POPPER (1951) vonden veranderingen die overeenkwamen met de resultaten van HARTMANN (1950 *b*)
Bij de acute gele lever atrophie vond HARTMANN (1950 *a*) sterke hypo-albuminaemie en sterke hypergamma-globulinaemie, terwijl alpha en beta bij hem eveneens verhoogd waren, bij STAUB echter waren deze tot kort voor de dood wat verlaagd of normaal.
Bij levercirrhose werd door LUETSCHER (1940) de albumine-verlaging en gamma-globuline-vermeerdering het eerst beschreven. Een jaar later vond hij (1941) bij enkele gevallen een verhoging van beta globuline. Vele publicaties over electrophorese bij levercirrhose zijn verschenen, waarin steeds de constante hoge gamma top met brede basis voorkomt (KABAT, HANGER, MOORE en LANDOW 1943; MALMROS en BLIX 1946; WIEDEMANN 1945, WUHRMANN en WUNDERLY 1947 *b*; THORN 1946; WUHRMANN 1946; COHEN 1947 *a* en *b*; RAFFSKY 1950; OLHAGEN 1947 *a*; MARTIN 1949; HARTMANN 1950 *a*; RICKETTS 1949 *b*, 1950).

MALMROS en BLIX (1946), OLHAGEN (1947 *b*), THORN (1946), FRANKLIN (1949) en WHITMAN (1950) vonden bij het grootste deel van de levercirrhose-patienten een verhoging van de $\varphi$ fractie, een top tussen beta en gamma globuline in, die volgens FRANKLIN (1949), WHITMAN (1950) en DEUTSCH (1946, 1947) moet worden opgevat als een gamma I fractie.
Vergelijkende onderzoekingen tussen de plasma- en ascites-eiwitten werden verricht door LUETSCHER (1940, 1941), GRAY (1943), MALMROS en BLIX (1946), RICKETTS (1949 *b*, 1950) en PAUL et al. (1949).
PAUL et al. (1949) vonden dat, uitgedrukt als percentage van het totale eiwit, de ascites-vloeistof steeds meer albumine, alpha I en gamma globuline, het plasma meer alpha II, beta en $\varphi$ globuline bevatte. De kleinere eiwitmoleculen van albumine, alpha I en gamma globuline zouden gemakkelijker de buikholte bereiken dan de eiwitten met grotere moleculen.

IV *Nierziekten: nephrotisch syndroom en nephritis*
Bij het nephrotisch syndroom wordt gevonden: zeer laag albumine, zeer hoge alpha en/of beta toppen, terwijl gamma normaal of verlaagd is (LONGSWORTH 1940; LUETSCHER 1939; MALMROS 1946; OLHAGEN 1947 *a* en *b*; BENHAMOU 1948; WIEDEMANN 1945; WUHRMANN 1946, 1949 *a*; LEIBETSEDER 1951; GRASSMANN 1951).
Hierbij moet men goed beseffen dat bij de klassieke electrophorese grote hoeveelheden lipoiden als $\alpha$ en $\beta$ lipoproteine meelopen en zo door verhoging van de brekingsexponenten tot fouten aanleiding geven (ARMSTRONG 1947; KENDALL 1947; WUHRMANN 1950).
Bij de zone-electrophorese is het hiermee geheel anders gesteld. De lipoiden worden hierbij niet gekleurd met amidozwart e.a. Om de lipoiden aan te tonen kan gebruik gemaakt worden van kleuringsmethoden met Sudan III (KUNKEL en SLATER 1952).
Met de methode van HEYDEMANN (1953) door uitzoutingen met stijgende geconcentreerde natriumsulfaatoplossingen kunnen, zoals reeds medegedeeld werd op blz. 45, de lipoiden afzonderlijk bepaald worden. De waarnemingen van KUNKEL en SLATER (1952) met de zone-electrophorese kwamen, in overeenkomstige gevallen van pathologische sera, goed overeen met de praecipitatiecurven van HEYDEMANN (MAJOOR en HEYDEMANN 1954).
Bij de glomerulonephritis wordt in beginstadia geen typisch electrophorese beeld gevonden. Bij een aantal langer bestaande nephritiden met sterke albuminurie wordt wel een vermeerdering van alpha II en beta globuline gevonden met een laag gamma globuline (THORN et al. 1945).
MAJOOR en HEYDEMANN (1954) vonden evenals KUNKEL en SLATER (1952) in sera van nephritis patienten dat het beta lipo-proteine een breder praecipitatiegebied heeft dan bij normale mensen het geval is. Zelf konden wij in één geval (We, blz. 61) volgens de methode van KUNKEL en SLATER de abnormaal brede lipo-proteine top, waarin zelfs lipoid in het gamma globuline gebied meeliep, aantonen. Het alpha lipo-proteine was ook in ons geval afwezig.

Na behandeling van de patient met *A. C. T. H.* werd de top smaller zowel aan de snel lopende als aan de langzaam lopende kant en viel tot slot in het normale gebied van beta lipo-proteine.

v *Endocrine ziekten*

In verband met de veranderingen die later beschreven worden door invloed van *A. C. T. H.* therapie, is het van belang te vermelden dat LEWIS en MC CULLAGH (1947) bij negen patienten, lijdende aan het syndroom van Cushing, lage albumine en lage gamma globuline waarden vonden, terwijl driemaal het alpha globuline verhoogd was. MC CULLAGH en LEWIS (1943, 1944, 1945) vonden bij Addison patienten en bij hypophysaire bijnier hypofuncties een verlaagd albumine, verminderd alpha II globuline, terwijl beta en gamma globuline normaal of licht verhoogd waren. De serumeiwitveranderingen bij endocrine stoornissen zijn overigens doorgaans weinig karakteristiek.

VI *Bloedziekten en reticulosen*

Bij enkele bloedziekten worden abnormale electrophorese patronen gevonden: Bij de acute myeloide leukaemie vond WIEDEMANN (1945) een sterke vermeerdering van gamma, terwijl PETERMANN (1948) normale beelden vond.
PETERMANN (1948) vond bij de chronische myeloide leucaemie een sterke stijging van gamma globuline. Bij de chronische lymphatische leukaemie vond BROWN (1948) in twee gevallen verhoging van alpha I en alpha II globuline; PETERMANN (1948) vond van drie gevallen eenmaal een verhoging van gamma globuline, terwijl WUHRMANN (1950) bij een aleukaemische vorm een sterke stijging van beta II globuline vond.
Bij de acute lymphatische leukaemien vond LONGSWORTH (1939) en BROWN (1948) ieder in één geval hypo-albuminaemie met verhoging van $\alpha$, $\varphi$, en $\gamma$ fracties. WUHRMANN (1952) vond, evenals wij, bij één geval van chronische lymphatische leukaemie een excessief laag gamma globuline.
Bij de ziekte van Hodgkin vond PETERMANN (1948) bij acht patienten, evenals ROTTINO (1948) bij 33 lijders aan deze ziekte, vermeerdering van alpha en/of gamma globuline.
Bij de ziekte van Besnier-Boeck werd allereerst door FISHER en DAVIS (1942) en later door SEIBERT en NELSON (1943) bij actieve processen een sterke vermeerdering van het gamma globuline gevonden. Ook bij reticulosen wordt nogal eens een verhoogd gamma globuline gevonden (OLHAGEN 1947 *a* en *b*, ESSER 1950, HEILMEYER 1950 en WEICKER 1950).

VII *Plasmocytoom, ziekte van Kahler. Kala Azar*

Bij het plasmocytoom of ziekte van Kahler, is de electrophorese van bijzondere betekenis, want dit is misschien wel de enige ziekte waarbij de electrophorese van direct diagnostisch belang kan zijn, hoewel men zich goed voor ogen dient te houden dat een normaal electrophorese patroon de ziekte van Kahler niet uitsluit. De eerste onderzoekers van het electrophorese beeld bij plasmocytoom zijn LONG-

WORTH, SHEDLOVSKY en MC INNES (1939) die bij drie door autopsie bevestigde gevallen, tweemaal een sterke vermeerdering van het $\beta$ globuline vonden en bij het derde geval een volkomen normaal beeld zagen. In vijf gevallen van KEKWICK (1940) vertonen vier een enorme gamma top en het vijfde geval had een sterke vermeerdering van $\beta_2$ globuline. Een uitvoerige opgave van alle literatuur op dit gebied gaat buiten het karakter van dit proefschrift. In dit verband noem ik alleen het onderzoek van JANSSEN en GORMSEN (1951) betreffende 36 myeloom patienten: negenmaal werd een normaal electrophorese beeld gevonden, viermaal een abnormale beta top en 23 maal een spitse gamma top. WUHRMANN, WUNDERLY en HUGENTOBLER (1949 *c*) vonden tevens in enkele myeloom sera hoge alpha II toppen. Afhankelijk van de bevindingen van het electrophorese beeld spreekt men wel van een alpha, beta of gamma myeloom.

*Kala Azar*. Door het onderzoek van WU (1922) is bekend geworden, dat bij de Kala Azar een hyperproteinaemie en hyperglobulinaemie wordt gevonden. COOPER et al. (1946) vonden bij twee patienten met Kala Azar een enorme stijging van de gamma top, die bij één zevenmaal hoger was dan normaal. De gamma top was verbreed en asymmetrisch, waaruit zij de conclusie trokken dat naast het normale gamma globuline een pathologisch gamma globuline bij Kala Azar bestaat.

VIII *Neoplasmata*

Een groot aantal neoplasmata werd onderzocht door DRYER (1949). Hierbij werd een daling van albumine met een corresponderende stijging van de globulinen gevonden, waarbij nu eens vooral het alpha globuline dan weer het gamma globuline verhoogd was. SEIBERT et al. (1947) vonden bij 23 diverse carcinomen in bijna alle gevallen een duidelijke verhoging van alpha II, terwijl het gamma globuline meest normaal was. Alleen bij enkele van de gevallen met levermetastasering werd een verhoging van gamma globuline gevonden. WUNDERLY en WUHRMANN (1948) konden dit laatste niet bevestigen en vonden een verhoging van $\beta$ globuline. Zij zeggen met nadruk dat de veranderingen onspecifiek zijn en voor de diagnose zonder betekenis zijn (WUHRMANN et al. 1947 *a*).

IX *Ondervoeding*

CHOW (1947) vond bij ondervoede mensen een afname van albumine en een toename van alpha globuline. CHOW zag bij patienten met een laag albumine-gehalte van het plasma, wanneer een eiwithydrolysaat werd toegediend, het albumine-gehalte stijgen en het verhoogde alpha-gehalte dalen.

Langdurige ondervoeding in concentratie-kampen leidt tot een stijging van het globuline en daling van het albumine (LAMY 1948).

Er zijn enkele waarnemingen bij hongertoestanden waarbij het fibrinogeen-gehalte van het plasma ook gedaald was (FOSTER 1922, HENRIQUES 1950, VARS 1930). HAM en CURTIS (1938 *a*) hebben dit niet gevonden.

X *Dierexperimenten. Aspecificiteit van de veranderingen*

Door proeven van GJESSING en CHANUTIN (1946, 1947 *a* en *b*) op honden,

werd aangetoond dat door de invloed van stikstofmosterd, brandwonden, terpentijn, röntgenstralen, beenfracturen een verhoging van alpha globuline na 48–72 uur, gepaard aan afname van albumine optrad, als – volgens SELYE (1950) – karakteristiek antwoord op stress. Het is niet duidelijk of tijdens een adaptatie syndroom het gamma globuline verandert.
CHANUTIN (1938) vond bij ratten na laparotomie een directe toename van fibrinogeen en globuline en een afname van albumine. – Na 18 dagen waren de spiegels van albumine en fibrinogeen weer normaal, maar de globuline-fractie bleef verhoogd.
Hieruit wordt het wel duidelijk dat deze veranderingen van het electrophoretische eiwitspectrum zeker niet specifiek zijn en voor de klinische diagnostiek doorgaans van geen betekenis zijn.

### *b* EIGEN ONDERZOEK VAN 33 SERA VAN PATIENTEN, LIJDENDE AAN DE ZIEKTEBEELDEN DIE HIER VOORAFGAAND WERDEN BESPROKEN.

*Bespreking van de resultaten* (zie resultaten blz. 61)
Bij de acute infectieuze processen werd een alpha globuline-vermeerdering gevonden. De patient met een chronische pelveo-peritonitis had een sterke gamma globuline vermeerdering. Bij twee lijders aan hepatitis, vertoonde, de één een verhoging van gamma met een $\varphi$ fractie (gamma I top), de andere een sterke beta globuline-vermeerdering. De patienten met levercirrhose hadden allen een zeer hoog gamma globuline. Eénmaal kon een $\varphi$ fractie duidelijk afgescheiden bepaald worden. De gammatoppen bij de levercirrhose waren alle gekenmerkt door een bijzonder brede basis. Het diagram bij de acute gele leveratrophie komt niet met HARTMANN (1950 *a* en *b*), wel met STAUB (1947) overeen.
Het serum van de genuine lipoid nephrose bij een kind van 9 jaar, vertoonde een sterke hypoalbuminaemie en bijzonder sterke alpha II globuline vermeerdering, terwijl het gamma globuline bijzonder laag was. Het electrophoretische lipoidspectrum werd reeds besproken (blz. 57). De sera van de nephritis-patienten met sterke albuminurie vertoonden vermeerdering van alpha II globuline. Het gamma globuline was bij beiden bijzonder laag. De derde nephritis-patient heeft een lichte albuminurie en een verhoogd beta globuline.
Bij de ziekte van Sheehan was het gamma globuline duidelijk verhoogd. Het syndroom van Morgagni had een vrijwel normaal patroon. Bij de onderzochte sera van patienten met bloedziekten valt in één geval de afwezigheid van gamma globuline op, zoals ook door WUHRMANN (1952) éénmaal werd gevonden. Bij de reticulosepatient was het alpha, bij de M. Hodgkin alpha + gamma globuline vermeerderd. De plasmocytomen waren alle vijf zogenaamde gamma myelomen. De toppen waren alle zeer steil, mogen karakteristiek genoemd worden. Bij het carcinoma mammae met skelet metastasen waren alpha en gamma globuline licht verhoogd. De lijder aan carcinoma ventriculi vertoonde alpha II + beta vermeerdering. Deze vermeerdering van beta globuline zou vooral gevonden worden bij metastasering ni de lever en bij primair lever carcinoom (WUNDERLY en WUHRMANN 1948).

| Diagnose | Init. | Albumine | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | Totaal eiwit | Voornaamste afwijkingen (verm. = vermeerdering) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Acuut infect.* | Rij | 31.4 | 10.8 | 29.2 | 10.5 | 18.1 | 6.41 | $\alpha$ verm. |
| | Le | 30.1 | 12.4 | 27.7 | 10.8 | 19.– | 7.90 | $\alpha$ verm. |
| | Du | 51.– | 6.2 | 21.– | 8.5 | 13.3 | 7.20 | $\alpha$ verm. |
| *Chron. infect.* | | | | | | | | |
| Chron. pelveoperitonitis | De | 44.7 | 3.8 | 7.8 | 10.– | 33.7 | 8.20 | $\gamma$ verm. |
| *Leverziekten:* | | | | | | | | |
| hepatitis | Bi | 38.6 | 3.1 | 4.5 | 7.6 | 12.5 + 33.7 | 7.22 | $\varphi$ (of $\gamma$ I fractie) + $\gamma_2$ verm. |
| | We | 46.3 | 3.1 | 7.5 | 29.1 | 15.– | | $\beta$ verm. |
| cirrhose | Gi | 39.2 | 3.7 | 7.– | 7.7 | 42.4 | 7.67 | $\gamma$ verm. |
| | Te | 21.4 | 4.1 | 6.3 | 7.2 | 19.9 + 41.1 | 6.85 | $\gamma_1 + \gamma_2$ verm. |
| | We | 34.4 | 8.3 | 8.6 | 10.6 | 38.1 | 6.80 | $\gamma$ verm. |
| ascites | Je | 18.3 | 8.8 | | 9.1 | 63.8 | 7.22 | $\gamma$ verm. |
| | Je | 32.3 | 10.– | | 4.8 | 53.– | 1.79 | $\gamma$ verm. |
| cirrhose + R.A. | Sche | 31.– | 6.2 | 14.4 | 11.3 | 37.1 | | $\alpha + \gamma$ verm. |
| acute gele lever atrophie | | 45.9 | 5.2 | 6.1 | 9.1 | 33.7 | 6.09 | $\gamma$ verm. |
| *Nierziekten* | | | | | | | | |
| genuine lipoid nephrose | We | 22.1 | 3.1 | 67.1 | 5.3 | 2.4 | 4.32 | $\alpha$ II verm. |
| nephritis + sterke albuminurie | v. Sch | 66.6 | 1.– | 22.5 | 4.9 | 5.– | 6.28 | $\alpha$ II verm. |
| | Nie | 33.3 | 6.6 | 40.– | 15.– | 6.– | 4.29 | $\alpha$ II verm. |
| nephritis | Blij | 48.3 | 6.3 | 12.8 | 17.5 | 15.1 | 5.65 | ($\alpha$ +) $\beta$ verm. |
| *Endocrine ziekten* | | | | | | | | |
| Sheehan | Ann. | 46.– | 2.7 | 4.7 | 7.2 | 39.4 | | $\gamma$ verm. |
| Morgagni | Tr. | 52.6 | 3.3 | 9.4 | 10.6 | 24.1 | | geringe $\gamma$ verm. |
| *Bloedziekten* | | | | | | | | |
| aleukaemische myeloide leukaemie | Me | 55.5 | 3.1 | 10.– | 12.– | 19.4 | 7.19 | normaal |
| chron. lymph. leukaemie | Sch. | 55.7 | 8.– | 10.6 | 13.3 | 12.4 | | normaal |
| | Br. | 69.4 | 6.– | 10.9 | 13.7 | 0.– | | $\gamma$ afwezigheid |
| para haemophilie | So. | 52.9 | 4.1 | 7.5 | 12.– | 23.6 | | geringe $\gamma$ verm. |
| *Reticulose* | | | | | | | | |
| | Gro. | 43.– | 9.5 | 13.2 | 12.3 | 22.– | 7.50 | $\alpha$ verm. |
| M. Hodgkin | Pa. | 35.7 | 8.– | 19.3 | 9.9 | 27.1 | 5.69 | $\alpha + \gamma$ verm. |
| Besnier-Boeck | Ver. | 38.6 | 4.– | 12.3 | 10.7 | 34.4 | | $\gamma$ verm. steile spitse top |
| *Plasmocytoom* | Wy | 25.5 | 3.1 | 5.3 | 8.1 | 58.– | 11.85 | $\gamma$ verm. |
| | De | 9.4 | 0.6 | 2.– | 2.2 | 85.8 | | $\gamma$ verm. |
| | Bla | 14.1 | 7.7 | | 7.2 | 71.– | 12.48 | $\gamma$ verm. |
| | Ee | 17.5 | 4.2 | | 6.3 | 72.– | 12.34 | $\gamma$ verm. |
| | Tro | 20.– | 2.9 | | 3.1 | 73.– | | $\gamma$ verm. |
| mammae | Br. | 37.3 | 7.1 | 13.4 | 13.5 | 28.7 | | $\alpha + \gamma$ verm. |
| *Neoplasma* ventr. | Bi. | 31.7 | 9.5 | 18.8 | 17.2 | 22.8 | | $\alpha + \beta$ verm. |

Bij onze patient werd een grote vaste hobbelige lever gevonden. WUHRMANN et al. (1947 *a*) zeggen met nadruk dat de electrophoretische serumveranderingen bij neoplasmata sterk wisselen en niet karakteristiek zijn.
Cryo-globulinen werden in dit gehele onderzoek niet gevonden.

*Conclusie.*
Bovenvermelde resultaten werden meegedeeld als aanvulling van de voorafgaande bespreking. Het zijn slechts enkele incidentele waarnemingen, waaraan geen conclusies kunnen worden verbonden.

SPECIEEL GEDEELTE

ONDERZOEKINGEN VAN DE EIWITTEN VAN SERUM EN GEWRICHTSVLOEISTOF BIJ COLLAGEENZIEKTEN.

# V

*a* ALGEMENE INLEIDING TER BEPALING VAN DE BEGRIPPEN RHEUMA, RHEUMATISCHE ZIEKTEN, COLLAGEENZIEKTEN EN PARARHEUMATISCHE AANDOENINGEN

*b* LITERATUUROVERZICHT VAN DE BLOEDEIWIT-VERANDERINGEN BIJ RHEUMATOIDE ARTHRITIS

*c* EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ RHEUMATOIDE ARTHRITIS

*d* VERGELIJKING MET DE RESULTATEN VAN ANDERE ONDERZOEKERS

## *a* ALGEMENE INLEIDING TER BEPALING VAN DE BEGRIPPEN RHEUMA, RHEUMATISCHE ZIEKTEN, COLLAGEENZIEKTEN EN PARARHEUMATISCHE AANDOENINGEN.

De rheumatische ziekten worden veelal met het vage woord 'rheuma' samengevat. Mogelijk door het misbruik van het woord 'rheuma' is het begrip in discrediet geraakt bij de klinici als een benaming voor allerhande pijnlijke toestanden van het locomotie-apparaat. Door de lekenpers is het woord 'rheuma' een volksbegrip geworden.

Terecht is door klinici een strenge differentiëring ingevoerd in de groep 'rheuma'-ziekten, zodat we kwamen tot een beter omlijnde diagnostiek. 'Rheuma' kent de klinicus niet, wel een rheumatoide arthritis, een febris rheumatica, een arthrosis of spondylosis deformans, een fibrositis, een arthritis urica, een periarthritis humero-scapularis e.a. In 1942 werd door KLEMPERER, POLLACK en BAEHR (1942) de term 'collageenziekten' ingevoerd, om hun opvatting tot uitdrukking te brengen dat aan een groep ziekten een gemeenschappelijk pathologisch-anatomisch substraat ten grondslag lag, waarin de veranderingen in het bindweefsel en vooral in zijn extracellulaire componenten fundamenteel waren. Vele klinici stemmen nu in met deze opvatting dat de collageenziekten een aantal acute of chronische ziekten zijn die alle morphologisch gekarakteriseerd zijn door meer of minder verspreide veranderingen van het bindweefsel en zij zijn het er over eens dat deze veranderingen de fundamentele anatomische uitdrukking zijn van het ziekteproces in febris rheumatica, rheumatoide arthritis, polyarteriitis nodosa, lupus erythematodes, sclerodermie en dermatomyositis.

Hierbij zijn ze zich zeker bewust van het feit dat ook in sommige gevallen van ernstige allergie en serumziekte deze veranderingen van het bindweefsel gezien worden, terwijl de fibrinoide necrose die als het eindpunt van deze veranderingen is te beschouwen, bij vele andere ziekten ook is te vinden. KLINGE (1933) was onder de indruk van het feit dat bij vele ziekten bindweefsel-veranderingen van fibrinoid karakter te zien waren, zoals thrombo-angiitis obliterans, dermatomyositis, maligne nephro-sclerosis, enkele nephritiden en subacute bacteriële endocarditis. Hij dacht bij deze ziekten aan een allergische pathogenesis. De term 'collageen'-ziekten is eigenlijk misleidend, omdat deze inhoudt dat deze ziekten gekenmerkt zijn door veranderingen van alleen de collagene vezels, terwijl in werkelijkheid het gehele complex van het bindweefsel met de tussenstof in het proces betrokken is.

Als we ons blijven realiseren dat de diagnose 'collageen'-ziekte geen diagnose is en evenveel diagnostische betekenis heeft als 'longziekte' of 'bloedziekte', dan bestaat tegen deze naamgeving geen enkel bezwaar en zij kan er toe bijdragen ons te verdiepen in de studie van het substraat van deze ziekten, n.l. het bindweefsel en de muco-polysacchariden. Mogelijk ten overvloede merk ik op, dat ik met het bovenstaande geenszins wil suggereren dat het oude begrip 'rheuma' en het nieuwe begrip 'collageen'-ziekten elkaar geheel dekken en dus identiek zijn. Slechts enkele van de 'rheuma'-ziekten blijken nu thuis te horen in de groep 'collageen'-ziekten, terwijl

omgekeerd enkele 'collageen'-ziekten niet gerekend kunnen worden tot de rheumatische ziekten; ik denk bij dit laatste aan een periarteriitis nodosa zonder gewrichtsverschijnselen of zonder 'rheumatische' verschijnselen.
Onder pararheumatische aandoeningen worden de musculoarthropathische manifestaties verstaan van lupus erythematodes disseminatus, polyarteriitis nodosa, diffuse sclerodermie en dermatomyositis. (FRIEDMAN et al. 1953).

### *b* LITERATUUROVERZICHT VAN DE BLOEDEIWIT-VERANDERINGEN BIJ RHEUMATOIDE ARTHRITIS

Publicaties over bloedeiwit-veranderingen bij rheumatoide arthritis komen reeds voor in een periode vóór de klassieke Tiselius-electrophorese.
DAVIS (1936) vond met de uitzoutingsmethode in het plasma bij lijders aan rheumatoide arthritis een afname van het albuminegehalte en toename van het fibrinogeen en globuline, vooral van de euglobuline fractie. TAUSSIG (1938) en SCULL, BACH en PEMBERTON (1939) bevestigden deze bevindingen. DAVIS (1936) vond verband tussen de ernst van de ziekte en het albumine-globuline-quotient. Het gemiddelde albumine-globuline-quotient van zijn normalen bedroeg 2.12. Bij ernstige, matig ernstige en rustige rheumatoide arthritis vond hij als gemiddelde waarden resp. 0.90, 1.47 en 1.52 als albumine-globuline-quotient.
De eerste publicaties over de serumeiwit-veranderingen bij rheumatoide arthritis, onderzocht volgens de Tiselius-electrophorese, komen uit Zweden in de oorlogsjaren.
SVARTZ (1943 en 1944) vond een verhoging van de relatieve alpha en gamma globuline-concentratie en een afname van het albumine-percentage. Hierna werden door verschillende auteurs op enkele uitzonderingen na dezelfde electrophoresepatronen bij rheumatoide arthritis gevonden: SVEDIN en BENGTSSON (1944), OLHAGEN (1944), LÖVGREN (1945), PERLMANN en KAUFMAN (1946), MALMROS en BLIX (1946), STERN en REINER (1946), LUETSCHER (1947), DOLE en ROTHBARD (1947), SVARTZ en OLHAGEN (1948), ROBINSON, DUFF, BLOCK en FOSTER (1950), WALLIS (1950), PAUL en ROUTH (1950), ROUTH en PAUL (1950), ROPES (1950), OLHAGEN (1952), ARMAN-CRUZ (1952), LAYANI (1952), KUKOWKA (1953), ROPES, PERLMANN, KAUFMAN en BAUER (1954).
OLHAGEN (1944 en 1952) en SVARTZ en OLHAGEN (1948) beschreven de mogelijke prognostische betekenis van de veranderingen van het electrophorese-beeld. Volgens hen zou een geïsoleerde alpha stijging, zonder stijging van de gamma globuline een betere prognose hebben dan een hoge gamma fractie met een normaal alpha globuline, hetgeen zij correleren met een slechte prognose. Bij onze eigen onderzoekingen wordt hier op teruggekomen. De hyperglobulinaemie wordt in het begin van de ziekte in hoofdzaak door de stijging van alpha globuline en in latere stadia door gamma globuline veroorzaakt. (SVARTZ 1944, OLHAGEN 1944, LÖVGREN 1945, PERLMANN et al. 1946, MALMROS en BLIX 1946, DOLE et al. 1947, LUETSCHER 1947, OLHAGEN 1952, ROPES et al. 1954.)

Het beta globuline wordt steeds normaal, althans nimmer significant verhoogd gevonden. In het begin van de ziekte wordt een matige toename van het 'C reactive protein' gevonden (WALLIS 1947, RAGAN et al. 1949 *a*). Eveneens werd een stijging van de 'niet specifieke hyaluronidase remmer' bericht (HAKANSON en LUFT 1949; SMITH en FABER 1949).
De stijging van fibrinogeen, alpha globuline, 'C reactive protein' en de niet specifieke hyaluronidase remmer gedurende de acute phase van de ziekte waargenomen, moet als een aspecifieke manifestatie worden beschouwd, veroorzaakt door een beschadiging van het mesenchym. Dezelfde veranderingen van deze eiwitstoffen worden bij een groot aantal andere ziekten gevonden, zoals bij infectieziekten door streptococcen en andere micro-organismen, physische en chemische beschadigingen alsook bij enkele gevallen van maligne tumoren.
De reden van vermeerdering van gamma globuline bij rheumatoide arthritis is niet duidelijk. Het is wel zeker dat deze vermeerdering niet uitsluitend kan veroorzaakt worden door antilichamen en dus alleen als teken van hyper-immuniteit moet worden beschouwd (COHN 1947).
Op onvoldoende gronden neemt WALLIS (1950) aan, dat de hypergamma-globulinaemie bij rheumatoide arthritis in hoofdzaak door hyperimmuniteit wordt teweeggebracht.
Het enige ons bekende nogal constant voorkomende antilichaam bij rheumatoide arthritis is de Rose-factor (ROSE et al. 1948).
Zoals uit onze onderzoekingen blijken zal bestaat er geen verband tussen de verhoging van gamma globuline en de Rose-test titer, bepaald volgens de gewijzigde proef van Rose (VAN LOGHEM-LANGEREIS 1950). Het is echter onzeker of de Rose-factor wel een antilichaam is.
VAN LOGHEM-LANGEREIS (1950) kon door absorptie met overmaat gesensibiliseerde rode cellen in Rose-factor bevattend serum, dat voorafgaand met amboceptor was geïncubeerd, deze Rose-factor niet verwijderen. Ook na herhaalde absorptie reageert het serum steeds weer met nieuwe gesensibiliseerde erythrocyten tot de oorspronkelijke titer. Zij is geneigd de Rose-factor te beschouwen als een katalysator, die de specifieke agglutinatie van schapenerythrocyten bevordert zonder zelf bij de reactie te worden verbruikt. De stijging van gamma globuline bij acuut rheuma wordt wel verklaard (RANTZ 1948) door de productie van antilichamen, zoals anti-streptolysine en antistrepto-hyaluronidase. DOLE et al. (1945) vonden een goede correlatie tussen de antistreptolysine en gamma globuline bij acuut rheuma. Het feit dat DOLE et al. (1945) het vermeerderde $\gamma$ globuline niet konden verwijderen door absorptie met levende streptococcen maakt de antilichamen-theorie bij acuut rheuma nog niet onmogelijk.

### *c* EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ RHEUMATOIDE ARTHRITIS

Bij het onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij rheumatoide arthritis werden door ons als probleemstellingen de volgende vragen gesteld:

I. Zijn er bij de rheumatoide arthritis veranderingen van het totale eiwitgehalte van het serum? Indien dit het geval is, zou het de voorkeur verdienen de verschillende electrophoretische eiwitfracties in absolute waarden op te geven. Blijkt het dat de totale eiwit-waarden per 100 ml serum niet verschillen van de spreiding bij de normalen, zodat de veranderingen zich afspelen in de onderlinge verhoudingen, dan is het overzichtelijker de waarden als relatieve percenten op te geven.
II. Wordt bij rheumatoide arthritis één speciaal patroon gevonden bij het electrophoretisch eiwitspectrum?
III. *a.* Is er sprake van een specifiek patroon bij de rheumatoide arthritis waardoor de electrophorese hier van waarde zou kunnen zijn voor de differentiële diagnostiek?
*b.* Wordt bij rheumatoide arthritis een patroon gevonden, qualitatief of quantitatief verschillend van andere rheumatische ziekten?
IV. Bestaan er bij die gevallen van rheumatoide arthritis met een niet duidelijk verhoogde bezinkingssnelheid wel veranderingen van het electrophoretisch eiwitspectrum, b.v. geringe verhoging van het gamma globuline, welke op zichzelf niet voldoende is om de bezinking te verhogen?
V. *a.* Is er verband tussen de duur van de ziekte en de resultaten van de electrophorese?
*b.* Bestaat er verband tussen de activiteit van de ziekte en de resultaten van de electrophorese?
VI. Is er verband tussen de titer van de Rose-test en het gamma globuline?

Ad. I Bij 50 patienten lijdende aan rheumatoide arthritis werd het totale eiwitgehalte van het serum bepaald en vergeleken met 50 normale sera.
De techniek die hiervoor werd gebruikt, is de biureet-bepaling volgens GORNALL (1949).
De gemiddelde waarde van 50 bepalingen bij normalen bedroeg: 7.25 gr % per 100 ml, de bovengrens was 8.5, de ondergrens 6.0 gr % per 100 ml.
Bij 50 rheumatoide arthritis-sera werd gevonden: gemiddelde waarde 7.12 gr per 100 ml, de bovengrens was 8.22, de ondergrens 6.30 gr per 100 ml.
Hieruit blijkt dus, dat de totale eiwitwaarden van de rheumatoide arthritis-sera geheel liggen in het normale gebied. Op grond hiervan worden de resultaten van het electrophorese-patroon, zoals ook veelal gebruikelijk is, opgegeven in hun relatieve waarden, als percentage van het totale eiwitgehalte. Dit wordt nog gesteund door het feit dat het relatieve patroon van de serumeiwitten van een normaal serum buitengewoon constant is en niet beïnvloed wordt door haemodilutie tengevolge van vochtretentie, waardoor de absolute waarden wel beïnvloed worden door veranderingen van het totale eiwitgehalte per 100 ml serum. Zie ook hoofdstuk over de ziekte van Bechterew, blz. 83.

Ad. II. Beantwoording van de vraag of bij rheumatoide arthritis één of meerdere patronen worden gevonden.
Hiertoe werden 75 sera van lijders aan rheumatoide arthritis onderzocht.

Van deze 75 sera bleek dat het albumine-gehalte, in relatieve waarden uitgedrukt, in 87.6 % verlaagd werd gevonden, zodat gezegd kan worden dat er in 87. 6 % een globuline-vermeerdering was.
Hiervan bleek in 48.7 % het gamma globuline significant verhoogd te zijn.
Het alpha I globuline was in 29 %, het alpha II in 60 % der gevallen significant verhoogd, terwijl het gezamenlijke alpha globuline-gehalte in 57 % der gevallen significant verhoogd werd gevonden. In 36 % was zowel alpha als gamma globuline verhoogd.
Het beta globuline werd in 26 % licht verhoogd gevonden, echter nimmer excessief verhoogd.
Op grond van deze uitkomsten kunnen we ter beantwoording van de vraag of er bij rheumatoide arthritis één of meer patronen zijn, zeggen dat in bijna 90 % het globuline-gehalte van het serum verhoogd was, in welke verhoging het alpha II globuline en/of gamma globuline (resp. 48.7 % en 60 %) het grootste aandeel hebben. Van één vast patroon is dus geen sprake, met dien verstande echter dat de globuline-vermeerdering nimmer door een duidelijke beta globuline-vermeerdering alleen werd teweeggebracht. Het was dus òf door alpha òf door gamma òf door beide dat de globuline-vermeerdering werd veroorzaakt in 72 % der gevallen, terwijl in de overblijvende 15 % de globuline-vermeerdering werd verkregen zonder significante vermeerdering van de fracties, die in deze gevallen alle net onder de bovengrens van normaal vielen.

Ad III*a*. In het vorige hoofdstuk werd een overzicht gegeven van ziekte-beelden waarbij een verhoogd alpha en/of gamma globuline kan worden gevonden, zodat aldaar reeds geconstateerd kon worden dat dit patroon geen diagnostische betekenis heeft. De hoge spitse toppen bij de ziekte van Kahler, de enorme verhoging van alpha II bij de lipoid nephrose, het excessief hoge gamma globuline op brede basis bij de lever-cirrhose, maken een uitzondering op deze regel, dat het electrophoretisch patroon in qualitatieve en quantitatieve zin geen diagnostisch hulpmiddel zou zijn. De resultaten van de serum-electrophorese bij rheumatoide arthritis in dit onderzoek bevestigen nog eens dat ook hier de veranderingen aspecifiek zijn en voor de differentiële diagnostiek zonder betekenis zijn. Vraag III *a* dient dan ook ontkennend beantwoord te worden.
Ad III *b*. Voor beantwoording van de vraag of er bij rheumatoide arthritis een patroon gevonden wordt, dat qualitatief of quantitatief verschilt van de electrophorese-beelden bij andere collageenziekten en andere gewrichtsziekten wordt verwezen naar de hoofdstukken over de ziekte van Bechterew (Hoofdstuk VI), febris rheumatica (Hoofdstuk VI), lupus erythematodes disseminatus, periarteriitis nodosa, diffuse sclerodermie en dermato-myositis (Hoofdstuk VII) en over andere gewrichtsziekten (Hoofdstuk VIII).

Ad IV. Ter beantwoording van de vraag of in die gevallen van actieve rheumatoide arthritis met een normale, of niet duidelijk verhoogde bezinkingssnelheid de electrophorese wel afwijkingen zou laten zien, konden wij negen patienten onderzoeken. In de volgende tabel wordt hiervan een overzicht gegeven.

*Gevallen van klinisch actieve rheumatoide arthritis met een niet duidelijk verhoogde bezinkingssnelheid, waarbij arbitrair de grens bij 10 mm wordt genomen.*

| | B.S.E. mm | Alb. | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 55.6 | 5.7 | 12.– | 13.1 | 22.7 | ondergrenzen van alb., resp. bovengrenzen globuline-fracties bij normale personen. |
| 1. | 9 | 58.6 | 5.4 | 15.5 | 9.7 | 10.8 | |
| 2. | 10 | 57.3 | 5.– | 6.7 | 9.6 | 21.4 | |
| 3. | 2 | 58.9 | 4.6 | 7.9 | 9.6 | 19.– | |
| 4. | 10 | 51.7 | 6.7 | 13.8 | 12.2 | 15.6 | |
| | 3 | 51.5 | 5.5 | 9.6 | 17.6 | 15.8 | na *A. C. T. H.* |
| 5. | 5 | 61.– | 3.1 | 8.3 | 11.2 | 16.4 | |
| 6. | 5 | 57.6 | 2.7 | 9.4 | 10.2 | 20.1 | |
| 7. | 6 | 59.2 | 5.7 | 10.2 | 11.3 | 13.6 | |
| 8. | 7 | 53.8 | 6.4 | 12.8 | 11.6 | 15.4 | |
| 9. | 2 | 60.– | 5.4 | 4.5 | 8.6 | 21.5 | |

Onder deze 9 patienten met een klinisch actieve rheumatoide arthritis waren 3 patienten met afwijkingen van het electrophorese-patroon. No 1 vertoonde een licht verhoogd alpha II globuline (15.5 %) bij een bezinkings-snelheid van 9 mm. Toen het proces later rustig was, werd een *B.S.E.* gevonden van 2 mm. No 4 en No 8 hebben een licht verlaagd albumine, corresponderende met een geringe verhoging van alpha I en alpha II globuline. Bij patient No 4 werden de alpha globulinen normaal na behandeling met *A. C. T. H.*; het normale gamma globuline veranderde niet, daarentegen ontstond een verhoging van het $\beta$ globuline, zoals nabehandeling met *A. C. T. H.* en cortison door ons wel eens meer werd gezien. De bezinking werd na *A. C. T. H.*-behandeling 3 mm. Ik meen dat de electrophorese geen nauwkeuriger maatstaf is van bepaling van de activiteit van de ziekte dan de bezinkingssnelheid. Bij geval No 1 en No 4 bleek de *B. S. E.* van 9 resp. 10 mm niet normaal te zijn, want later werden deze 2 resp. 3 mm toen het proces rustig was.

Ad V *a* en *b*. *Onderzoek van de serumeiwit-verhoudingen bij rheumatoide arthritis, in verband met mogelijke correlatie met de duur en activiteit van de ziekte.*

In het onderzoek van de serumeiwitten bij rheumatoide arthritis werden 75 patienten betrokken, zowel mannen als vrouwen. Deze groep werd op twee wijzen onderverdeeld. In de eerste plaats werd een onderverdeling naar de duur van de ziekte en in de tweede plaats een verdeling naar de ernst van het klinische verloop aangebracht. Wat de ziekteduur betreft, vond een onderverdeling plaats van patienten die korter dan 1 jaar aan een rheumatoide arthritis lijdende waren, voorts van die patienten met een ziekteduur tussen 1 en 5 jaar en tenslotte de gevallen die langer dan 5 jaar bestonden.

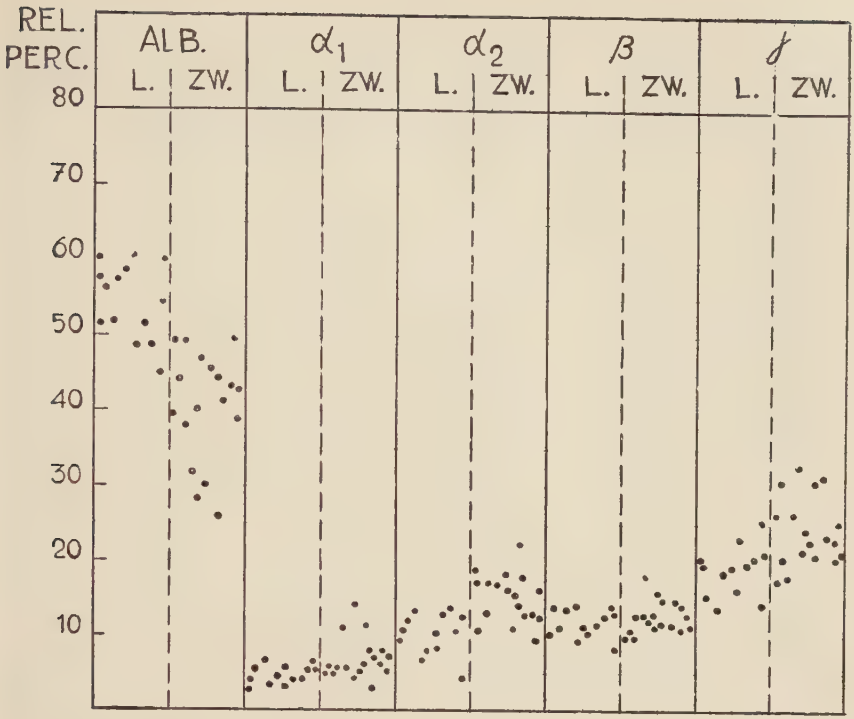
Uitgaande van deze verdeling naar de ziekteduur bleken 31 patienten in de 'korter

dan 1 jaar'-groep, 22 patienten in de '1–5 jaar'-groep en 22 patienten in de 'langer dan 5 jaar'-groep te behoren.
Slechts die patienten werden in dit onderzoek betrokken die door mijzelf klinisch werden behandeld. Zodoende kon tevens een verdeling naar de activiteit van het klinisch verloop worden gemaakt. De maatstaven, die hiervoor werden aangelegd, berusten op de door STEINBROCKER et al. (1949) aangegeven criteria. Deze criteria zijn enerzijds afhankelijk van de functionele capaciteit van de patienten om diverse dagelijkse verrichtingen uit te voeren, anderzijds afhankelijk van de progressie van röntgenbeeld, spieratrophie, extra-articulaire verschijnselen (b.v. noduli en tendovaginitis), gewrichtsdeformaties en ankylosen. Op deze wijze wordt een zo objectief mogelijke indeling nagestreefd. Stellig wordt op deze wijze een verdeling van de activiteit en progressie van het ziekte-proces verkregen die mooier lijkt dan de werkelijkheid is, omdat er nu immers, zoals veelal in de geneeskunde het geval is, vele geleidelijke overgangen zijn die niet in onze schema's passen. Aangezien nu sinds 1949 deze indeling volgens STEINBROCKER bij het onderzoek van rheumatoide arthritis overal ingang heeft gevonden, heb ik deze indeling bij mijn materiaal eveneens toegepast, mede op grond van het feit dat een betere indeling mij niet bekend is.
*a.* Classificatie van de functionele capaciteit, uitgedrukt in:
*Klasse* I: alle gewone verrichtingen zijn zonder handicaps uitvoerbaar.
*Klasse* II: er is beperkte beweeglijkheid van één of meer gewrichten, doch de patient is nog in staat zonder hulp de dagtaak te vervullen.
*Klasse* III: er is een sterke functiebeperking, waardoor de patient nog met moeite zich zelf kan helpen in alles, maar voor de dagelijkse taak hulp behoeft.
*Klasse* IV: de patient is invalide.
*b.* Classificatie van de progressie van de rheumatoide ziekte, (zie tabel bovenaan pag. 72).
De indeling van STEINBROCKER beoogde bovenal objectieve maatstaven aan te leggen voor de veranderingen van het ziekteproces onder invloed van therapie. Een complete remissie wordt aangeduid met 'Graad I'. Een sterke verbetering, waarbij nog geringe zwellingen en geringe bewegingsbeperking bestaan, waarbij het röntgenbeeld geen progressie vertoont en de bezinking nog niet geheel normaal is gevonden, wordt aangeduid met 'Graad II'. Een geringe verbetering van de algehele toestand, van de bezinking en de zwellingen zonder progressie, ook niet van het röntgenbeeld is 'Graad III'. Tot slot is er 'Graad IV', wanneer de patient niet verbeterd of verergerd is.
De groep van 75 patienten werd ter bepaling van de activiteit en progressie van het ziekteproces in twee caterogieën verdeeld, aangeduid als klinisch 'licht' (*L*) en 'zwaar' (*Zw*) verlopend geval. In de eerste groep (*L*) werden die patienten ondergebracht die voldeden aan STEINBROCKERS Klasse I, II en Stadium I en II, terwijl in de tweede groep (*Zw*) Klasse III, IV en Stadium III en IV werden ondergebracht. Aangezien de 'korter dan 1 jaar'-groep niet gepaard gaat met stadium III en IV van progressie, wordt hierbij uitgegaan van alleen de functionele capaciteit (Klasse I en II contra III en IV).

| | Rö. beeld | Spier-atrophie | Extra art. versch. | Gewr. deform. | Ankylosen |
|---|---|---|---|---|---|
| *Stadium* I | osteoporosis | — | — | — | — |
| *Stadium* II | osteoporosis kraakbeen of subchondr. destructie | + | (+) | — | — |
| *Stadium* III | osteoporosis kraakbeen en bot destructie | ++ | (+) | subluxatie uln. deviatie hyper extensie | — |
| *Stadium* IV | als III, tevens benige ankylose | ++ | (+) | als III | fibr. of benige ankylose |

In de figuren op pag. 73, 74 en 75 wordt een overzicht gegeven van de zone-electrophorese-onderzoekingen van 75 patienten die op bovenbeschreven wijze in 6 groepen werden ingedeeld, naar ziekteduur in drie groepen, welke drie afzonderlijk werden gescheiden in clinisch lichte en zware gevallen. Onderstaande tabel geeft een overzicht van de gemiddelden van deze groepen met de bijbehorende standaarddeviaties.

| | Albumine | Alpha I | Alpha II | Beta | Gamma |
|---|---|---|---|---|---|
| Normaal (50) | 64.– ± 3.11 | 3.4 ± 0.9 | 7.6 ± 1.6 | 10.– ± 1.2 | 15.– ± 2.85 |
| Verwachte grenzen | 55.6 (ondergrens) | 5.7 (bovengrens) | 12.– (bovengrens) | 13.1 (bovengrens) | 22.7 (bovengrens) |
| R.A. | | | | | |
| < 1 jr. (31) | 46.2 ± 9.2 | 6.1 ± 2.5 | 13.– ± 3.9 | 12.3 ± 2.1 | 22.4 ± 5.2 |
| licht (13) | 54.– ± 5.– | 4.7 ± 1.2 | 10.4 ± 2.8 | 11.9 ± 1.7 | 19.– ± 3.4 |
| zwaar (18) | 40.6 ± 7.2 | 7.– ± 2.7 | 14.9 ± 3.5 | 12.5 ± 2.2 | 24.9 ± 4.8 |
| R.A. | | | | | |
| 1–5 jr. (22) | 47.5 ± 8.– | 5.4 ± 1.5 | 11.4 ± 2.8 | 10.8 ± 1.8 | 26.2 ± 7.6 |
| licht (8) | 53.1 ± 4.6 | 5.3 ± 0.6 | 11.3 ± 2.1 | 11.– ± 1.8 | 19.3 ± 5.6 |
| zwaar (14) | 44.3 ± 7.4 | 5.4 ± 1.8 | 11.4 ± 3.1 | 10.7 ± 1.8 | 28.2 ± 7.3 |
| R.A. | | | | | |
| > 5 jr. (22) | 38.2 ± 7.9 | 6.1 ± 2.– | 13.– ± 3.5 | 10.2 ± 2.5 | 32.6 ± 10.9 |
| licht (5) | 39.4 ± 6.3 | 6.3 ± 1.9 | 13.7 ± 2.1 | 8.8 ± 1.1 | 31.8 ± 8.5 |
| zwaar (17) | 37.9 ± 7.3 | 6.1 ± 2.3 | 12.8 ± 3.9 | 10.6 ± 2.8 | 32.7 ± 11.4 |

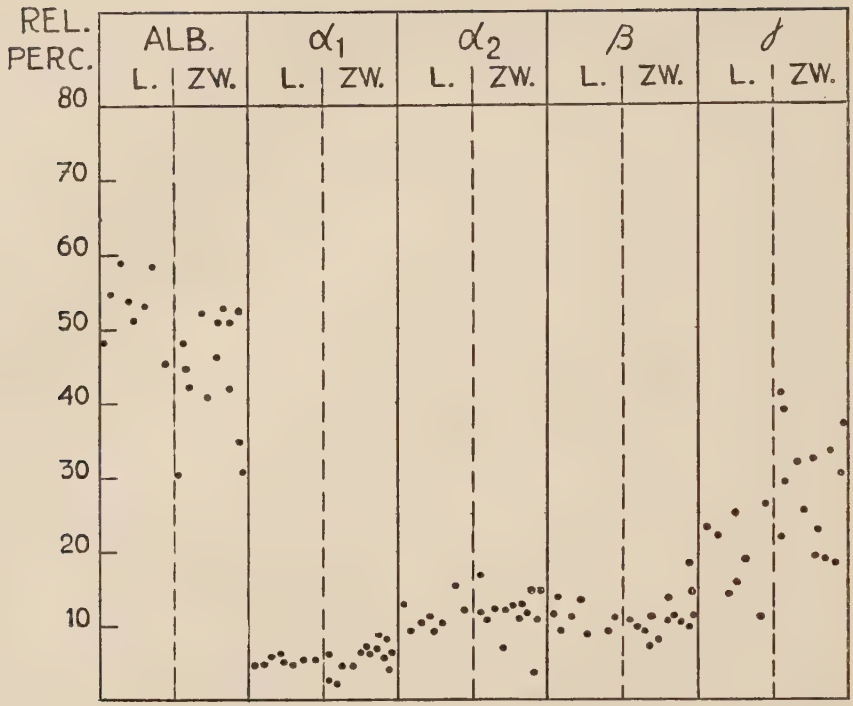



RHEUMATOIDE ARTHRITIS
L. = LICHTE GEVALLEN, ZW. = ZWARE GEVALLEN
KORTER DAN 1 JAAR

*Resultaten*

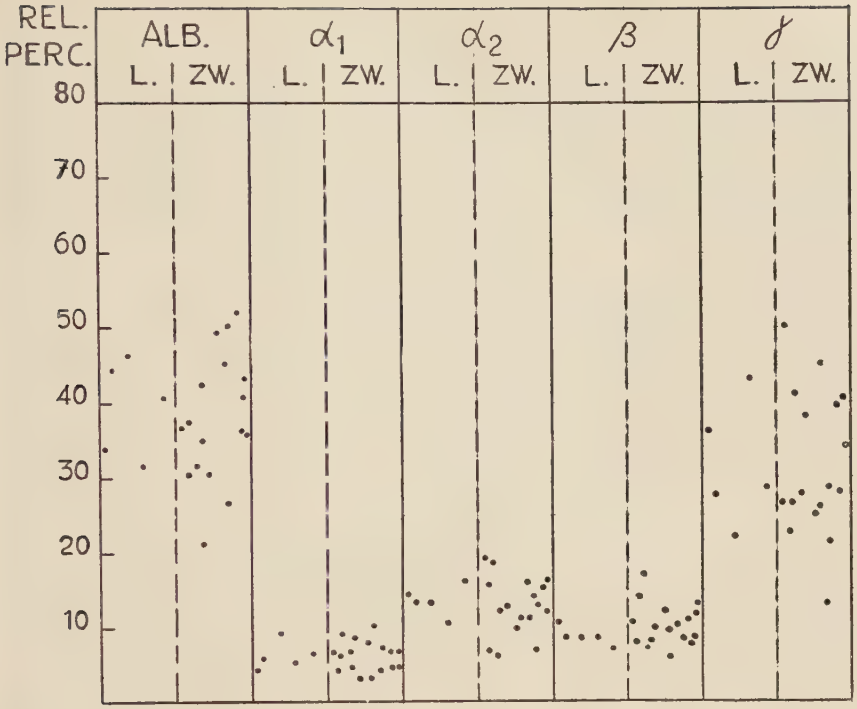
*a. Vergelijking van de drie ziekteduur-groepen.*
Het gemiddelde van de albumine-percentages is in de groep patienten met een ziekteduur van langer dan 5 jaar significant lager dan de gemiddelde waarden van de 'korter dan 1 jaar'- en '1–5 jaar'-groep, die onderling gelijk waren. De gemiddelde relatieve alpha I waarden zijn in de drie groepen gelijk en licht verhoogd.
Het gemiddelde alpha II percentage is in de 'korter dan 1 jaar'-groep slechts iets verhoogd en hoger dan in de '1–5 jaar'-groep, waarvan het gemiddelde nog binnen de normale grenzen valt, en is gelijk met de 'langer dan 5 jaar'-groep.
De beta globuline-waarden zijn in de drie groepen gelijk en normaal. Het gamma globuline-gemiddelde neemt toe met de duur van de rheumatoide arthritis.

*b. Vergelijking van de groepen, met inachtneming van de ernst van het ziekteproces (groepen L en Zw.)*
In de 'korter dan 1 jaar'-groep is er een opvallend verschil tussen de klinisch licht




RHEUMATOIDE ARTHRITIS
L. = LICHTE GEVALLEN, ZW. = ZWARE GEVALLEN
TUSSEN 1 EN 5 JAAR

en ernstig verlopende gevallen, vooral tot uiting komende in de gemiddelde waarden van albumine, alpha II en gamma globuline-percentages. Voor de '1–5 jaar'-groep geldt hetzelfde met uitzondering van het alpha II globuline, dat in beide groepen gelijke gemiddelden heeft. Het gamma globuline-gemiddelde is in deze groep 19.3 % (*L*) resp. 28.2 % (*Zw*).
De gemiddelde albumine-waarden zijn 53.1 % (*L*) en 44.3 % (*Zw*).
De '*L*'-gevallen in de '1–5 jaar'-groep hebben een zelfde gemiddelde gamma globuline-waarde als de '*L*'-gevallen van de 'korter dan 1 jaar'-groep (19 %) en vallen binnen de normale grenzen.
De klinisch ernstige gevallen in de 'korter dan 1 jaar'-groep en in de '1–5 jaar'-groep hebben gamma globuline-gemiddelden van 24.9 % resp. 28.2 % en zijn beide boven de normale bovengrens.
In hoeverre de klinisch licht verlopende oude gevallen ('langer dan 5 jaar'-groep) een lager gamma globuline-gemiddelde hebben dan de ernstige oude gevallen is uit dit onderzoek niet uit te maken, aangezien de lichte gevallen van deze groep in het materiaal niet voldoende in aantal voorkwamen.




RHEUMATOIDE ARTHRITIS
L. = LICHTE GEVALLEN, ZW. = ZWARE GEVALLEN
LANGER DAN 5 JAAR

*Samenvatting:*
Bij de verse gevallen (korter dan 1 jaar) die klinisch ernstig verlopen *(Zw)* is het alpha globuline-gemiddelde verhoogd ($\alpha_1 = 7\%$; $\alpha_2 = 14.9\%$), terwijl het gamma globuline-gemiddelde slechts licht verhoogd is (24.9%).
Dit gaat ten koste van een duidelijke daling van het albumine-gemiddelde. Doch eveneens bij de oude groep (langer dan 5 jaar) komen hoge alpha globuline-waarden voor en de gemiddelden verschillen niet significant. Het verband tussen de eiwitveranderingen en de ernst van de ziekte komt het duidelijkst tot uitdrukking in de significant verlaagde gemiddelde albumine-percentages. Deze gemiddelde waarden waren in alle groepen beneden de ondergrens van normaal. Het gamma globuline-gemiddelde neemt toe met de duur van de ziekte (resp. 22.4%, 26.2% en 32.6%). In verband hiermede zouden jarenlange vervolgstudies van de individuele gevallen vereist zijn om te mogen zeggen dat bij een progressief verlopende rheumatoide arthritis het gamma globuline in de loop der jaren toeneemt.
In dit onderzoek staan ons hieromtrent uit de aard der zaak nog geen gegevens ter beschikking.

### *d* VERGELIJKING VAN DEZE RESULTATEN MET ENKELE GEGEVENS VAN ANDERE ONDERZOEKERS.

De mogelijke prognostische betekenis van de electrophoretische bevindingen werden door OLHAGEN (1944 en 1952) en SVARTZ, OLHAGEN (1948) beschreven. Deze onderzoekers meenden aan een geïsoleerde alpha globuline-stijging een betere prognose te moeten toeschrijven dan aan een gamma globuline-stijging met lage alpha globuline.

Deze uitspraak wordt door mijn onderzoek niet bevestigd. Weliswaar wordt doorgaans bij beginnende actieve gevallen een alpha globuline-stijging waargenomen met slechts een geringe toename van gamma globuline, maar hieraan mag naar mijn mening geen betere prognose worden toegeschreven dan aan een geïsoleerde gamma globuline-vermeerdering. De klinische toestand van één van de patienten met een geïsoleerde alpha II globuline-stijging (17.2%) is twee jaar later zeker niet verbeterd, er is zelfs een geringe progressie van het proces; na deze twee jaar is de electrophorese onveranderd en toont wederom een geïsoleerde alpha II stijging (18.4%). Aan de andere kant is het klinisch verloop van een zeer actieve rheumatoide arthritis met een geïsoleerde gamma globuline-stijging (32%) na twee jaar zo gunstig dat bijna van een complete (spontane) remissie kan worden gesproken (gamma globuline 21.9%). Een andere patient met een actief proces in Jan. 1952 heeft een geïsoleerde gamma globuline-vermeerdering (26.2%). Twee jaar later is de toestand prachtig verbeterd en het gamma globuline bedraagt 19.4%. De electrophorese van serumeiwitten bij rheumatoide arthritis geeft een goede indruk van de activiteit van het proces op dat moment, maar is zonder prognostische betekenis. Dit zou ook zeer verwonderlijk zijn, daar het klinisch verloop vaak zo wisselend en onvoorspelbaar is, dat spontane klinische verbeteringen en zelfs bijna totale remissies de prognostisch somber gestemde klinicus volkomen kunnen verrassen. Het electrophoretisch beeld is een afspiegeling van de activiteit van de ziekte, welke wellicht in de meeste gevallen nauwkeuriger wordt bepaald door het physische onderzoek en de bezinkingssnelheid van de erythrocyten.

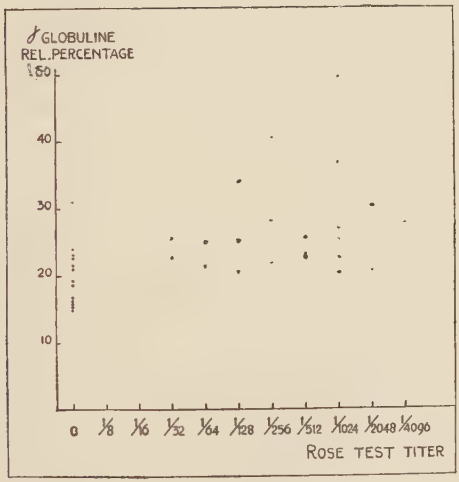
Met de uitspraak van OLHAGEN (1944 en 1952) dat vroeg in het verloop van een actief proces het alpha globuline vermeerderd is, terwijl in latere stadia een overheersing van het gamma globuline plaats vindt, zoals ook door DOLE en ROTHBARD (1947) en door ROPES et al. (1954) wordt beweerd, kan ik mij in grote trekken verenigen met die restrictie dat er in mijn onderzoek talrijke uitzonderingen hierop voorkomen.

Ook bij andere ziekten als roodvonk, acuut rheuma (DOLE et al. 1945) en bij tuberculose (SEIBERT, NELSON 1942) is waargenomen een stijging van alpha globuline vroeg in het verloop en een overheersing van gamma globuline in latere stadia. Dat klinische remissies van de rheumatoide arthritis gepaard gaan met verbeteringen van het electrophorese-beeld, waarbij het verhoogde gamma globuline wederom een normale waarde bereikt, werd eveneens waargenomen door DOLE (1947), ROBINSON (1950), ROUTH (1950), OLHAGEN (1950), BERGLUND (1951) en ROPES (1954).

ROPES, PERLMANN, KAUFMAN en BAUER (1954) stelden een onderzoek van de serum-electrophorese (Tiselius-techniek) in bij 32 patienten lijdende aan rheumatoide arthritis. Het verband tussen de serumeiwit-veranderingen en de ernst van de ziekte kwam ook in dit onderzoek vooral tot uiting in de verlaging van het albumine. Bij de lichte gevallen vonden zij een gemiddelde albumine-waarde van 50.1 %. In mijn onderzoek werd 54 % in de 'korter dan 1 jaar'-groep, en 53.1 % in de '1–5 jaar'-groep gevonden. Bij de ernstige gevallen vonden zij een albumine-gemiddelde van 41.1 %, terwijl in mijn onderzoek waarden van 40.6 %, 44.3 % en 37.9 % werden gevonden in de drie groepen ingedeeld naar ziekteduur. Voor het gamma globuline vonden ROPES et al. slechts een geringe toename van het gamma globuline-gemiddelde. Zij onderzochten 8 patienten met een ziekteduur langer dan 10 jaar (gamma gemiddelde 19.9 %) en 4 patienten waarbij de ziekte korter dan 1 jaar bestond (gamma gemiddelde 15.7 %). Aangezien dit onderzoek van hen in verband met de ziekteduur zeer kleine getallen betreft, meen ik dat vergelijking van deze waarden met eigen resultaten geen zin heeft, te meer omdat de technieken verschillen (zie hoofdstuk II).

Tot slot volgt de beantwoording van de zesde vraag: Is er verband tussen de titer van de Rose-test en het gamma globuline?

Ad VI. Zoals uit onderstaande figuur blijkt, bestaat er geen lineair verband tussen de titer van de Rose-test en het gamma globuline-gehalte. Dit wijst er niet op dat de Rosefactor geen gamma globuline zou kunnen zijn (zie blz. 67).



# VI

*a* EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ DE ZIEKTE VAN BECHTEREW

*b* VERGELIJKING MET DE RESULTATEN VAN ANDERE ONDERZOEKERS

*c* DE BLOEDEIWIT-VERANDERINGEN BIJ FEBRIS RHEUMATICA.

## *a* EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ DE ZIEKTE VAN BECHTEREW

*(spondyl-arthritis ankylopoetica, rheumatoide spondylitis)*

Vooral in de Amerikaanse literatuur wordt veelal de ziekte van Bechterew bij klinische onderzoekingen over één kam geschoren met de rheumatoide arthritis, zodat in de statistieken deze beide ziekten nogal eens tezamen worden genomen in één groep. Velen zien in de ziekte van Bechterew een rheumatische aandoening van de wervelkolom die men nauw verwant acht aan de rheumatoide arthritis. Verschillende recente onderzoekingen o.a. over het negatief uitvallen van verschillende serologische reacties zoals de Rose-test, in tegenstelling tot de uitkomsten van deze Rose-test bij rheumatoide arthritis en over de afwijkende pathologisch-anatomische bevindingen (VAN SWAAY 1950), naast de reeds bekende geheel andere reactie op therapie (bij Bechterew röntgenbestraling en bij rheumatoide arthritis goud) nopen echter tot grote voorzichtigheid wat betreft het aannemen van verwantschap tussen spondylarthritis en rheumatoide arthritis (KUIPERS, DE BLÉCOURT en GOSLINGS 1954).

Instemmende met bovengenoemde motiveringen heb ik dan ook gemeend het eiwitonderzoek van de lijders aan M. Bechterew in een apart hoofdstuk te moeten vermelden.

Hiertoe werden de sera van 22 lijders aan deze ziekte, 21 mannen en 1 vrouw, onderzocht met de volgende vraagstellingen:

I. Kan door electrophoretisch onderzoek van de sera bij de ziekte van Bechterew steun worden gegeven aan de motiveringen dat de ziekte van Bechterew wel of niet nauw verwant is aan de rheumatoide arthritis? Gezien het feit dat de electrophorese bij vele andere ziekten van niet rheumatische aard veranderingen kan aantonen in de vorm van alpha en/of gamma globuline-stijgingen in het bloedserum, is het op het eerste gezicht zeer onwaarschijnlijk dat wij hierdoor nader zouden worden ingelicht, daar de specifiteit van de serum-electrophorese slechts voor een enkele ziekte geldt (zie blz. 69).

II. De ziekte van Bechterew kan zich klinisch manifesteren als een aandoening van de wervelkolom en sacro-iliacale gewrichten, met of zonder mede-aandoening van de periphere gewrichten, in welk laatste geval de ziekte grote gelijkenis gaat vertonen met de rheumatoide arthritis. Het probleem dat nu gesteld wordt, betreft de vraag of er overeenkomst of verschil is tussen de groep met aandoening van de periphere gewrichten en de groep zonder aandoening van de periphere gewrichten. 10 patienten van de eerste groep en 12 patienten van de tweede werden bestudeerd.

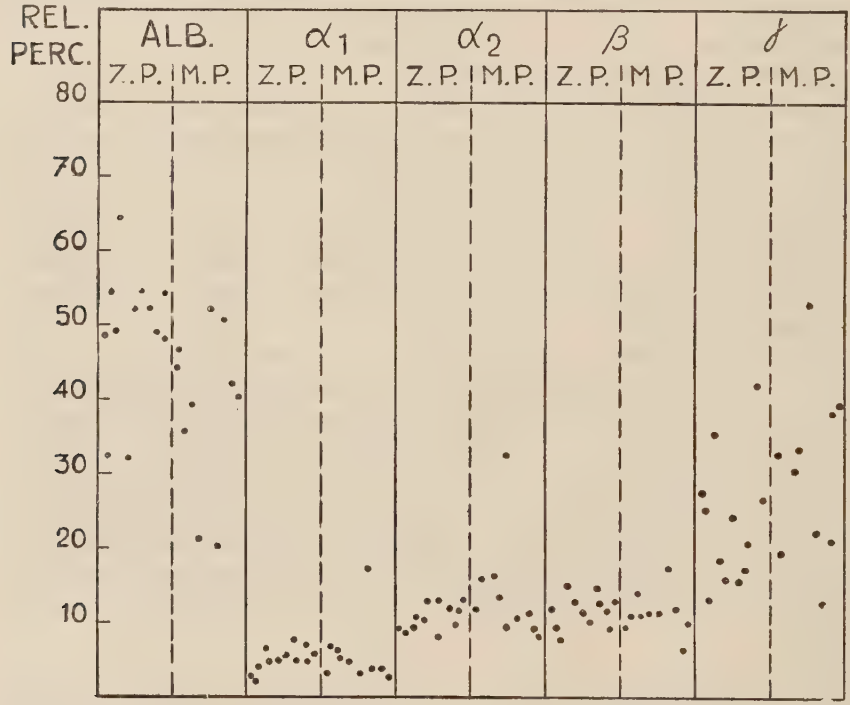
III. Worden bij 22 lijders aan de ziekte van Bechterew, evenals bij 50 lijders aan rheumatoide arthritis totale eiwitwaarden gevonden die binnen de normale grenzen vallen?

Ad I. De gemiddelde waarden van de serumeiwitfracties van 22 lijders aan de ziekte van Bechterew bedragen:

Albumine 44.7%, alpha I 5.3%, alpha II 12.3%, beta 11.7% en gamma 26.–%.

Deze waarden komen zeer sterk overeen met de bevindingen bij rheumatoide arthritis: een sterke daling van albumine, ten koste van een stijging van alpha II en gamma globuline. De gemiddelde Bechterew-waarden als gehele groep tonen sterke overeenkomst over de gehele linie met de gemiddelde waarden van de rheumatoide arthritis-groep met een ziekteduur van 1–5 jaar, welke groep eveneens 22 patienten telt. Het spreekt vanzelf dat deze overeenkomst niets zegt over de ziekteduur van deze lijders aan de ziekte van Bechterew.
Bij de ziekte van Bechterew is het begin van het ziekteproces zelden aan te geven, daar de ziekte in het begin zeer vage klachten geeft, zodat pas jaren later de diagnose gesteld wordt wanneer er evidente symptomen zijn. Op grond hiervan werd deze groep Bechterew-patienten niet ingedeeld naar ziekte-duur. Zoals reeds in de aanvang gezegd, mogen we uit de overeenkomst der resultaten van de eiwitfracties geen enkele conclusie trekken wat betreft het aannemen van een verwantschap tussen beide ziekten.

Ad II In de tabel op pag. 84 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de groep met en zonder mede-aandoening van periphere gewrichten (zie ook onderstaande figuur).
De gemiddelden van deze groepen verschillen opvallend wat betreft de albumine




BECHTEREW Z.P. = ZONDER AANDOENING PERIPHERE GEWRICHTEN
M.P. = MET AANDOENING PERIPHERE GEWRICHTEN

alpha II en gamma globulinen. Gezien echter de grote standaarddeviaties van albumine en gamma globuline in beide groepen en van alpha II globuline in de groep met periphere gewrichtsaandoening, zijn deze verschillen niet zo bijzonder belangrijk. Wel is het bijzonder opvallend dat de standaarddeviatie van het alpha globuline-gemiddelde (10.8 %) bijzonder laag is, t.w. 1,5 in de groep lijders aan M. Bechterew zonder mede-aandoening van de periphere gewrichten.
Zou de ontstekingsfactor bij de ziekte van Bechterew, zonder mede-aandoening van periphere gewrichten, gering zijn? De pathologische anatomie licht ons hierover nader in sinds recente onderzoekingen van VAN SWAAY (1950). Aan de intervertebrale en sacro-iliacale gewrichten vond VAN SWAAY diffuse proliferatie van vaatloos kraakbeen, er ontstaat een kraakbenige ankylose. Tegelijkertijd groeit myelogeen bindweefsel het kraakbeen in. Dit wordt geresorbeerd en ter plaatse wordt been afgezet en er ontstaat tenslotte een benige ankylose. De ankylose van de wervellichamen ontstaat door verbening van de randen van de tussenwervelschijven, nadat eerst omvorming in kraakbeen aan de peripherie van de tussenwervelschijven heeft plaats gehad. VAN SWAAY meent dus dat er geen verbening of kalkneerslag in de ligamenta longitudinalia optreedt, deze lopen in zijn preparaten onveranderd buiten de verbening langs. Verder vindt hij geen tekenen van een ontstekingsproces en stelt daarom de benaming spondylosis in plaats van spondylarthritis ankylopoetica voor. Hij beschouwt de arthritis aan de periphere gewrichten als een secundair verschijnsel (zie KUIPERS, DE BLÉCOURT en GOSLINGS 1954). Hoe aantrekkelijk het zou zijn mijn electrophoretische bevindingen met de normale alpha globuline-waarden te scharen achter deze opvatting van VAN SWAAY, waarbij dus de ontstekingsfactor afwezig is bij de vorm zonder periphere arthritiden, toch meen ik mij hiervan op grond van de bevindingen in deze kleine groep vooralsnog te moeten onthouden, al ware het alleen maar omdat ik zeven gevallen van ernstig actieve rheumatoide arthritis in de groep van 75 patienten heb gevonden met een laag alpha II globuline met weliswaar sterker verhoogd gamma globuline.

Ad III. De totale serumeiwit-waarden verschillen met de rheumatoide arthritis-sera, aangezien 3 × (2 × in de groep met, eenmaal in de groep zonder periphere arthritiden) een bijzonder hoge totale eiwitwaarde werd gevonden resp. 10.2, 9.1 en 10.8 gram per 100 ml, aldus gevonden bij een serie van 22 patienten, lijders aan de ziekte van Bechterew in tegenstelling tot 53 onderzoekingen bij de rheumatoide arthritis, waarbij geen waarden werden genoteerd hoger dan 8.2 gr per 100 ml. (Een patient die tevens lijdende is aan de ziekte van Besnier-Boeck vertoonde een totale eiwitwaarde van 9.3 gr per 100 ml en werd buiten dit onderzoek gehouden.)
Bij de patient met een totale eiwitwaarde van 10.2 gr per 100 ml werd op grond van een tevens bestaande ernstige haemorrhagische diathese een onderzoek ingesteld naar cryoglobulinen en macroglobulinen. Zowel het eerste onderzoek als het tweede verricht met de ultra-centrifugetechniek (door Dr. H. Reerink, van 't Hoff laboratorium te Utrecht, hoofd: Prof. Dr. J. Th. G. Overbeek) vielen negatief uit, zodat een macro- en cryo-globulinaemie (WALDENSTRÖM 1944, 1948, 1949, zie blz. 43) kon worden uitgesloten.

### *b* VERGELIJKING VAN DE EIGEN RESULTATEN MET GEGEVENS VAN ANDERE ONDERZOEKERS

Zoals in de aanvang van dit hoofdstuk werd gezegd, wordt in de anglo-amerikaanse literatuur de ziekte van Bechterew gerekend tot de rheumatoide arthritis met localisatie in de wervelkolom en sacro-iliacale gewrichten, zodat mij van die kant geen gegevens ter beschikking staan.

JACQUELINE et al. (1951) delen hun resultaten bij het serum-eiwitonderzoek van 22 patienten met de ziekte van Bechterew mede, bepaald volgens de uitzoutingsmethode. Op grond hiervan zijn vergelijkingen onmogelijk. Deze onderzoekers vonden bij vier patienten totale eiwitwaarden boven 9 gram per 100 ml, doch zij verkregen op 33 rheumatoide arthritis-sera ook vijfmaal een totale eiwitwaarde hoger dan 9 gram per 100 ml en concluderen dat gevallen van rheumatoide arthritis en vooral van de ziekte van Bechterew, die neiging tot ankyloseringen tonen zonder tekenen van proliferatie, een verhoogd totaal eiwitgehalte van het plasma of serum hebben.

Wat de rheumatoide arthritis betreft kan ik dit niet bevestigen. Mijn Bechterew-patienten met deze hoge totale eiwitwaarden waren extreme gevallen. Hoe gevaarlijk het is in dit opzicht te generaliseren toont het volkomen normale serum-electrophoresebeeld van een lijder aan de ziekte van Bechterew in extreem stadium van ankylosering, echter zonder periphere arthritis, maar met ernstige neurologische verschijnselen, in de vorm van een totale dwarslaesie.

*Overzicht van de resultaten van de electrophorese der serumeiwitten bij de ziekte van Bechterew.*

| | Gehele groep (22) | | Zonder periph. gewr. (12) | | Met periph. gewr. (10) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | gemiddelde | standaardeviatie | gemiddelde | standaardeviatie | gemiddelde | standaardeviatie |
| Albumine | 44.7 | ± 10.9 | 49.8 | ± 9.2 | 39.3 | ± 11.– |
| Alpha I | 5.3 | ± 3.– | 5.– | ± 1.8 | 5.7 | ± 4.2 |
| Alpha II | 12.3 | ± 5.1 | 10.8 | ± 1.5 | 14.1 | ± 7.– |
| Beta | 11.3 | ± 2.5 | 11.7 | ± 2.1 | 11.5 | ± 2.9 |
| Gamma | 21.6 | ± 10.2 | 23.3 | ± 8.5 | 29.4 | ± 9.7 |

### *c* BLOEDEIWIT-VERANDERINGEN VAN LIJDERS AAN ACUUT RHEUMA, FEBRIS RHEUMATICA.

De veranderingen van de plasma-eiwitten nemen onder de chemische veranderingen bij febris rheumatica een belangrijke plaats in.

DAVIS (1936) en LUETSCHER (1940) vonden een daling van het albumine en een

stijging van fibrinogeen en globuline. Ook bij deze rheumatische aandoening wordt in het begin in hoofdzaak een alpha en in latere stadia een gamma globuline-stijging waargenomen, zoals onder meer door MASSELL (1937), LUETSCHER (1940), DOLE (1945), RUTSTEIN (1945), MALMROS (1946), WALKER (1950) en LEINWAND (1951) werd medegedeeld.
Het beta globuline werd steeds normaal gevonden (zie ook DOLE 1945).
Herhaaldelijk wordt een toename van het 'C reactive protein' gevonden (zie blz. 45) dat blijkt thuis te horen in het alpha I globuline (PERLMANN 1943). Dit eiwit blijkt bij inactieve of tot rust gekomen gevallen een lage waarde te hebben (zie o.m. MC CARTY 1947, ROTHBARD 1948 en ANDERSON 1950).
De muco-polysacchariden en de niet specifieke hyaluronidase remmers zijn eveneens verhoogd (DORFMAN 1950 en ADAMS 1951).
De stijging van het gamma globuline wordt door RANTZ et al. (1948) verklaard door productie van antilichamen, waarmee dan onder meer antistreptolysine en anti-strepto-hyaluronidase beoogd worden. Een correlatie werd gevonden tussen de anti-streptolysine titer en het gamma globuline (DOLE et al. 1945).
In het hoofdstuk rheumatoide arthritis werd reeds vermeld, hetgeen voor de toename van bovengenoemde eiwitfracties bij febris rheumatica eveneens geldt, dat deze veranderingen aspecifiek zijn en bij vele andere ziekten hetzij van infectieuze, hetzij van neoplasmatische aard gevonden worden (blz. 69).
De toediening van corticotrophine en cortison bij lijders aan febris rheumatica gaat gepaard met een daling van het fibrinogeen (FEARNLEY 1951 en OGRYZLO 1951), van de niet specifieke hyaluronidase remmer (DORFMAN 1950 en ADAMS 1951), alsook, maar in langzamer tempo van de muco-polysacchariden.
In mijn onderzoek van de serumeiwit-veranderingen bij rheumatische ziekten werden slechts acht gevallen van febris rheumatica betrokken. Aangezien dit in hoofdzaak een kinderziekte is en slechts bij hoge uitzondering in actief stadium in de interne kliniek of polikliniek voorkomt, is het aantal door mijzelf onderzochte gevallen, zoals ik aan dit onderzoek vereist achtte, beperkt gebleven tot acht gevallen. Dit getal is te klein voor een statistische bewerking. Vermeld wordt slechts dat de drie klinisch actieve gevallen éénmaal een toename van alpha I (7.8%), tweemaal een toename van alpha II (19.4% en 22.5%) en éénmaal een duidelijke stijging van gamma globuline (31.5%) vertoonden. Een patientje met een geprotraheerd verloop heeft normale alpha waarden, maar een gamma globuline van 30.5%. Een vers actief geval van febris rheumatica heeft een electrophorese-beeld van albumine 40.–%, alpha I 4.6%, alpha II 19.4%, beta 12.8% en gamma 23.2%. Na vier weken behandeling met corticotrophine is het proces op dat moment klinisch rustig en de electrophorese is geheel normaal gevonden: Albumine 61.–%, alpha I 4.5%, alpha II 6.–%, beta 10.5% en gamma 18.–% (zie hoofdstuk corticotrophine, cortison en serumeiwit-veranderingen blz. 115). De vier overblijvende gevallen verkeerden alle in een klinisch inactief stadium en hadden normale electrophorese-beelden van het serum.

# VII

*a* ALGEMENE BESCHOUWING OVER DE COLLAGEENZIEKTEN LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS, POLY-ARTERIITIS NODOSA, SCLERODERMIE EN DERMATO-MYOSITIS. HISTOLOGISCHE VERANDERINGEN.

*b* LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS. METHODEN VAN ONDERZOEK NAAR L. E.-CELLEN
EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS.
VERGELIJKING MET DE RESULTATEN VAN ANDERE ONDERZOEKERS.

*c* DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ PERI-ARTERIITIS NODOSA, DIFFUSE SCLERODERMIE EN DERMATO-MYOSITIS.
ENKELE EIGEN WAARNEMINGEN.

## *a* ALGEMENE BESCHOUWING OVER DE COLLAGEENZIEKTEN LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS, POLY-ARTERIITIS NODOSA, SCLERODERMIE EN DERMATO-MYOSITIS. HISTOLOGISCHE VERANDERINGEN.

In 1942 voerden KLEMPERER, POLLACK en BAEHR de benaming 'diffuse collageenziekten' in, om hiermee een groep ziektebeelden te identificeren die gekarakteriseerd zijn door morphologische veranderingen van het bindweefsel.
Het normale bindweefsel bestaat enerzijds uit cellen, waarvan de fibroblast de belangrijkste is, verder macrophagen en mastcellen. Anderzijds wordt de ruimte tussen deze cellen opgevuld door vezels en door een homogene tussenstof (grondsubstantie). Er zijn elastine-, reticuline- en collagene vezels. De tussenstof bestaat uit eiwit-polysacchariden-complexen (muco-polysacchariden).
Zowel over de morphologie, physiologie en patho-physiologie van het bindweefsel zijn momenteel onderzoekingen gaande met behulp van moderne technieken van weefselcultures, electronen-microscopie, röntgen-diffractie en isotopen (*C14* glycine, *N*15 proline), voor de bestudering van de structuur, de stofwisseling ('turn-over'), reïnstitutie en biosynthese van de vezels (vooral de collagene vezels) en de mucopolysacchariden van de tussenstof.
Er is nog geen zekerheid over de vraag of de vezels gevormd worden door de fibroblasten, dan wel uit de tussenstof neergeslagen worden. Het lijkt momenteel waarschijnlijk dat de vezelvorming zonder tussenstof kan plaats vinden (PORTER 1951).
De proeven van SCHMITT (1954) zijn suggestief voor de opvatting, dat de mucopolysacchariden bij deze vezelvorming uiteindelijk toch een rol spelen en van invloed zijn op de 'spacing' van de fibrillen. Ook de onderzoekingen van NEUBERGER (1954) gaan in deze richting. Hij onderzocht het bindweefsel van de konijnenhuid door fractionnering. Hierbij kreeg hij drie fracties:

I. alkalisch oplosbare collagene fractie;
II. zuur oplosbare collagene fractie;
III. een niet oplosbare collagene fractie.

De alkalische fractie is zeer zuiver en bevat geen tyrosine, deze fractie zou volgens hem de 'precursor' van de collagene vezel zijn, die wel tyrosine bevat, en heeft perioden van 210 Å.
Werden aan deze alkalisch oplosbare fractie nu muco-polysacchariden toegevoegd dan ontstonden vezels van 640 Å perioden. Of hierin de muco-polysacchariden uitsluitend als katalysator werken, of toch ingebouwd worden in de collagene vezel is nog een vraag.
Bij de pathologische veranderingen van de collageenziekten zijn drie groepen te onderscheiden (LYMAN DUFF 1952).
I. Door vermeerderde activiteit van de zijde der fibroblasten vindt een vermeerdering van de tussenstof plaats, die mogelijk ook abnormaal is, waaruit in het centrum de fibrinoide degeneratie resulteert.
Er is zeer lang gedacht dat de fibrinoide degeneratie wordt teweeggebracht door praecipitatie van fibrine (NEUMANN 1880). ALTSHULER en ANGEVINE (1949) spreken dit tegen en zijn van mening dat de vorming van fibrinoid materiaal uit-

sluitend gebeurt uit de tussenstof van het bindweefsel door praecipitatie van zure muco-polysacchariden.
Dit wordt op dit moment echter niet algemeen geaccepteerd.
'KELLGREN et al. (1951 en 1953) onderzochten door middel van röntgen-diffractie en electronen-microscopie de fibrinoide degeneratie in de noduli bij rheumatoide arthritis. Zij zagen naast gedeelten met normale collagene vezels, andere met min of meer gedesintegreerde vezels, alsook gedeelten waar het voor collageen typische röntgenogram geheel verdwenen was. Onder de electronen-microscoop toonden de laatste gedeelten alleen amorph materiaal en geen collagene vezels meer. Er was volgens hen in grote lijnen een overeenstemming met de histologische praeparaten, gekleurd met verschillende technieken. In het centrum van de fibrinoide degeneratie was geen vezelstructuur te zien. CONSDEN et al. (1953 *a*, *b*), uit de groep onder leiding van BYWATERS in Taplow, onderzochten van de chemische zijde de rheumatische noduli en vonden een lager hydroxyproline-gehalte dan waaraan de normale collagene vezel rijk is, maar hoger gehalte aan tyrosine en polysacchariden dan in niet rheumatisch weefsel. Tyrosine komt in de normale collagene vezel slechts in zeer lage concentratie voor. Tenslotte is het dus niet bekend of de primaire verandering bij fibrinoide degeneratie plaats vindt in de collagene vezel dan wel in de tussenstof' (zie GOSLINGS 1954 *b*).
II. Er is een proliferatieve activiteit van de fibroblasten en productie van nieuw collageen bindweefsel.
III. Er zijn ontstekingsverschijnselen, granulomateus van karakter met aggregatie van eenkernige cellen.
De mate waarin deze drie componenten van het pathologisch proces zich kenbaar maken verschilt sterk bij de verschillende collageenziekten.
Dat de reactie van het bindweefsel door nog onbekende oorzaken op deze wijze verloopt mag ons niet brengen tot de gedachte dat deze ziekten dezelfde oorzaak hebben.
Tot de groep der collageenziekten worden de volgende ziekten gerekend: acuut rheuma, rheumatoide arthritis, lupus erythematodes disseminatus systematicus, poly- (peri-) arteriitis nodosa, diffuse sclerodermie en dermato-myositis.
Bezien we deze ziekten van klinische zijde vanuit het gezichtspunt van de musculo-arthropathische manifestatie dan zou ik in navolging van TEILUM (1946) en FRIEDMAN et al. (1953) een onderscheid willen maken tussen enerzijds acuut rheuma en rheumatoide arthritis, beide duidelijk gedefinieerde ziekten die doorgaans niet moeilijk te diagnostiseren zijn, te beschouwen als rheumatische ziekten en anderzijds lupus erythematodes disseminatus, poly-arteriitis nodosa, diffuse sclerodermie en dermato-myositis te beschouwen als para-rheumatische ziekten waarbij het musculo-arthropathische verschijnsel slechts één van de klinische manifestaties is van de ziekte, b.v. de arthropathie van lupus erythematodes disseminatus. Deze laatste ziekte nu kan zich echter ook mono-symptomatisch manifesteren als een ziekte van het hart, de ziekte van Libman-Sachs.
Ook de peri-arteriitis nodosa kan verlopen zonder enig musculo-arthropathisch verschijnsel, als snel verlopende nephritis met hypertensie. Een aandoening van het

spier- en gewrichtsstelsel is voor deze ziekten geen conditio sine qua non, echter wel voor de dermato-myositis. Aan de andere kant kennen we ook gevallen van acuut rheuma, die zich alleen manifesteren in het hart en niet in spieren en gewrichten. Dit alles maakt een indeling in rheumatische en para-rheumatische ziekten vrij zwak. De lupus erythematodes disseminatus kan jarenlang verlopen onder een klinisch beeld waarbij alleen de gewrichten zijn aangedaan en waarop zonder aarzeling de diagnose op rheumatoide arthritis of atypisch acuut rheuma wordt gesteld totdat daarna verschijnselen optredend aan inwendige organen (pleuritis, pericarditis, endocarditis, pneumonische verschijnselen in de ondervelden, nephritis) of aan de huid, de ware aard van het ziektebeeld duidelijk maken. De belangrijke vondst van HARGRAVES et al. (1948) die bij patienten met *L. E. D.* bij een bepaalde techniek in preparaten van beenmerg en bloed eigenaardige vervormde leucocyten die een egaal, rose rood insluitsel in het cellichaam hebben opgenomen, aantroffen welke cellen sindsdien bekend zijn als *L. E.*-cellen, luidde een nieuwe phase in, waarin vele voorheen duistere ziektebeelden nu op grond van de vondst der *L. E.*-cellen, als lupus erythematodes disseminatus konden worden gediagnostiseerd. Hierna is het probleem van de specificiteit dezer cellen opgedoken; enerzijds wordt deze cel als een onspecifieke weefselreactie opgevat, anderzijds werden aanvankelijk 'vals positief' beschouwde gevallen later toch typische *L. E. D.*-gevallen in klinische zin.

| | R.A. | FEBRIS RHEUM. | L.E.D. | P.A.N. | DIFFUSE SCLEROD. | DERMATO MYOSITIS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GEWRICHTEN | ⊞ | ⊞ | ⊞ | ⊞ | ⊞ | + |
| HUID | + | + | ⊞ | ± | ⊞ | ⊞ |
| HART (HIST.) | + | ⊞ | ⊞ | + | ⊞ | + |
| LONGEN | ± | + | ⊞ | + | ⊞ | + |
| NIEREN | ± | + | ⊞ | ⊞ | — | ± |
| SEREUZE VLIEZEN | ± | ⊞ | ⊞ | ± | ± | ± |
| NODULI | ⊞ | ⊞ | ± | ± | — | — |
| TR.DIGESTIVUS | — | — | — | + | ⊞ | ⊞ |
| PERIPH.ZENUWEN | ± | — | + | ⊞ | — | ± |
| EOSINOPHILIE | — | — | + | ⊞ | — | + |
| R.E.S. | + | — | + | + | — | — |
| HYPER GAMMA GLOBULINAEMIE | + | + | ⊞? | ± | + | + |
| L.E.CELLEN | ? | | ⊞ | | | |

— VOOR ZOVER BEKEND NIET VOORKOMEND

± WEINIG VOORKOMEND

\+ NOG AL EENS VOORKOMEND

⊞ OVERWEGEND VOORKOMEND

GOSLINGS (1954 *b*) onderzocht in de rheumatologische klinieken in Leiden en Noordwijk enkele honderden patienten op deze *L. E.*-cellen in het bloed; bij deze patienten was tevoren de diagnose meestal zonder aarzeling op min of meer typische rheumatoide arthritis gesteld. – 'Bij ongeveer 10% dezer patienten kon het phenomeen van de *L. E.*-cellen aangetoond worden. Verschillende patienten hadden in de loop van hun gewrichtsziekte wel afwijkingen aan andere organen vertoond, die als min of meer verdacht voor lupus erythematodes disseminatus beschouwd zouden kunnen worden. Bij velen kwam echter de positieve vondst als een volkomen verrassing.'
GOSLINGS vraagt zich af of dit gevallen zijn van *L. E. D.* die monosymptomatisch verlopen onder het beeld van een rheumatoide arthritis. – 'Of moet de specificiteit van het phenomeen betwijfeld worden? Of liggen deze beide ziekten pathogenetisch dicht bij elkaar?'
In de tabel op pagina 91 wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste systemen die bij de collageenziekten in het pathologisch proces betrokken zijn, enerzijds de overeenkomst, anderzijds de verschillen in klinisch, chemisch en morphologisch gedrag tot uitdrukking brengende.
Zoals boven medegedeeld, is het phenomeen van de *L. E.*-cel onvoldoende bekend. Het is dus nog niet zeker of een positieve *L. E.*-celvondst bij een rheumatoide arthritis ons het recht geeft de diagnose op lupus erythematodes te stellen.
Vooralsnog lijkt dit niet het geval te zijn. Op grond van de onzekerheid hiervan op dit moment wordt op de bestemde plaats hiervoor een vraagteken geplaatst in de tabel (blz 91).
Bij de andere collageenziekten is het voorkomen van *L. E.*-cellen niet voldoende nagegaan om hierover een oordeel te vellen. Derhalve werden de bestemde plaatsen hier opengelaten in de tabel.

## *b* LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS. METHODEN VAN ONDERZOEK NAAR L. E.-CELLEN. EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS. VERGELIJKING MET DE RESULTATEN VAN ANDERE ONDERZOEKERS.

*Lupus erythematodes disseminatus. Klinisch overzicht.*
De gedissemineerde vorm van lupus erythematodes werd het eerst beschreven door KAPOSI (1872). De ziekte werd aanvankelijk beschouwd als een huidziekte van tuberculeuze aetiologie en als een variant van de chronische discoide lupus. Later werd de ziekte herkend als een gegeneraliseerde bindweefselziekte (OSLER 1895, KEEFER en FELTY 1924, CLUXTON 1943).
De naam is ongelukkig, daar deze wijst op een tuberculeuze aetiologie, welke nimmer bewezen kon worden.
De ziekte komt vooral bij vrouwen voor, in hoofdzaak in het vierde en vijfde decennium, de prognose is ernstig en de oorzaak onbekend.

Door de vermeerderde belangstelling in de laatste jaren voor rheumatische ziekten, maar bovenal door de ontdekking van de *L. E.*-cel door HARGRAVES et al. (1948) werden vele gevallen van acute, subacute en chronische rheumatische aandoeningen herkend als gedissemineerde lupus erythematodes, die tevoren zouden zijn gediagnostiseerd als acuut rheuma of rheumatoide arthritis. In tabel op pagina 91 zijn de bij de ziekte betrokken systemen bijeengebracht. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de ziekte niet zelden mono- of bisymptomatisch verloopt. Het ziektebeeld is uitermate variabel. De volgende drie groepen worden wel onderscheiden naar klinisch verloop:

*a.* een acute vorm waarin de afwijkingen van inwendige organen praevaleren en waarbij geen of slechts minimale afwijkingen van de gewrichten worden gevonden. Een exacerbatie van de subacute of chronische huidvorm kan onder dit beeld verlopen.

*b.* een subacute vorm, waarin de gewrichtsverschijnselen op de voorgrond staan en grote gelijkenis met acuut rheuma of acute rheumatoide arthritis vertoont. De bevinding van de aandoening van sereuze vliezen of inwendige organen verplicht de klinicus een onderzoek in te stellen naar *L. E.*-cellen in het periphere bloed of beenmerg.

*c.* een chronische vorm waarbij de gewrichtsverschijnselen niet te onderscheiden zijn van die van een rheumatoide arthritis, doch waarbij het optreden van aandoeningen van inwendige organen of huid de diagnose lupus erythematodes disseminatus doet overwegen. In deze gevallen kan een positieve *L. E.*-celtest een krachtige steun voor het stellen van de diagnose lupus erythematodes disseminatus betekenen.

Aan de specificiteit van de *L. E.*-cel werd in het voorafgaande een beschouwing gewijd. Een éénmalige negatieve *L. E.*-celtest mag ook niet de klinische diagnose *L. E. D.* doen verwerpen, aangezien het zeer goed denkbaar is dat technische tekortkomingen ons dit phenomeen doen ontgaan. Anderzijds zijn er zeker gevallen van een volledig klinisch syndroom van *L. E. D.* waarbij bij herhaling het phenomeen niet werd aangetoond.

Het onderzoek van *L. E.*-cellen in het beenmerg of periphere bloed vereist een korte beschrijving.

In 1948 beschreven HARGRAVES, RICHMOND en MORTON een bijzonder lichaam ingesloten in segmentkernige neutrophile leucocyten van beenmerg van patienten lijdende aan gedissemineerde lupus erythematodes. Zij meenden dat hieraan een lytisch-phagocyterend phenomeen ten grondslag lag waardoor het insluitsel òf als gedegenereerde kern van de betrokken segmentkernige neutrophile leucocyt zelve òf als een geautolyseerde gephagocyteerde kern van een andere segmentkernige neutrophile leucocyt, zou ontstaan.

HASERICK en SUNDBERG (1948) bevestigden deze bevindingen van HARGRAVES et al. en beschreven het voorkomen van twee of meer granulocyten die eenzelfde massa amorph materiaal omsloten. Een groep cellen met een dergelijk insluitsel had de vorm van een rozet en wordt nu algemeen aangeduid met de naam *L. E.*-phenomeen. In het met verdunde Giemsa-oplossing gekleurde preparaat is de *L. E.*-cel een apart liggende granulocyt die een rose-rood insluitsel opgenomen heeft,

dat lichter van kleur is dan de kern(en) en structuurloos is. De kernen zijn daarbij meestal naar de rand gedrukt en de gehele cel heeft de vorm van een zegelring.
Hiernaast vindt men twee of meer granulocyten die een zelfde amorph rose lichaam omsluiten in de vorm van een rozet. Hierin nemen soms ook wel monocyten deel. Soms ziet men twee of drie insluitsels in een granulocyt.
De algemene mening is dat voor het mechanisme van de *L. E.*-celvorming twee phasen noodzakelijk zijn. De eerste is de autolyse van kernmateriaal door de z.g. '*L. E.*-factor', een abnormale eiwitfractie voorkomende in het gamma globuline van het plasma, bij een hoog percentage van lijders aan lupus erythematodes disseminatus aanwezig.
HASERICK en LEWIS (1950 *b*) isoleerden deze factor (later genaamd Haserick-factor), die antigene eigenschappen bleek te bezitten.
Werd deze bij konijnen ingespoten dan ontstonden antilichamen die in staat waren het *L. E.*-phenomeen bij lijders aan *L. E. D.* te blokkeren. Deze *L. E.*-factor wordt verantwoordelijk geacht voor de autolyse van leucocyten bij *L. E. D.* De tweede phase is de phagocytose door de intacte leucocyt van het geautolyseerde celmateriaal. Dat het insluitsel afkomstig is van kernmateriaal toonden HARGRAVES et al. (1948) aan door middel van de Feulgen-reactie. Vermoedelijk treedt er een depolymerisatie in van desoxyribonucleinezuur in één der kernen van de granulocyt. De insluitsels worden niet alleen in neutrophile segmentkernige leucocyten gevonden, echter ook in metamyelocyten, staafkernige neutrophilen, in segmentkernige eosinophile leucocyten en monocyten (MOYER en FISHER 1950 en LEE et al. 1951).
HARGRAVES (1948) dacht dat het insluitsel alleen afkomstig zou zijn van een rijpe neutrophile segmentkernige leucocyt. HASERICK en SUNDBERG (1948) dachten dat het afkomstig was van een lymphocyt.
Later opperden HASERICK et al. (1950 *a*) hun mening dat het insluitsel van megakaryocytaire of thrombocytaire origine was. De proeven van MOYER en FISHER (1950) zijn nog vermeldenswaard. Zij suspendeerden normale rijpe neutrophile leucocyten in normaal bloed enerzijds en in een suspensie van 'lymphocyten' van een leukaemie patient anderzijds. Aan beide suspensies werd plasma van een patient lijdende aan *L. E. D.* toegevoegd. Zij vonden een veel groter aantal *L. E.*-cellen in de suspensie van de leukaemische lymphocyten.
LEE et al. (1951) delen mede dat het insluitsel zowel van lymphocytaire als neutrophiel leucocytaire origine kan zijn.
ROHN en BOND (1952) hebben de beide phasen die tot het *L. E.*-phenomeen leiden door supra-vitale kleuringstechniek (SABIN 1923) vervolgd. Zij beschrijven dat op een gegeven ogenblik de kernen van een apart liggende neutrophile granulocyt zwellen met accentuering van de chromatine-structuur; hierna wordt de kernmembraam onduidelijk en de chromatine-structuur begint te desintegreren. Uiteindelijk is de cel veranderd in een amorphe kleurloze massa, waarin nog enkele neutrophile granulae aan de peripherie zichtbaar zijn met partieel of geheel behoud van de celmembraam. Wanneer de autolyse volledig is, begeven zich één of meer rijpe intacte granulocyten naar deze cel om deze te phagocyteren.
De autolysis van granulocyten in peripheer bloed en beenmerg is op zichzelf geen

voor *L. E. D.* specifiek verschijnsel, want ook normaal bloed dat men een tijd lang laat staan, vertoont tekenen van kernautolysis. Dit proces vindt bij intoxicaties of bij mechanische of thermische laesies in versnelde mate plaats.
Evenmin is phagocytose op zich zelf, zoals bekend, een specifiek verschijnsel. Dat het *L. E.*-celphenomeen toch min of meer specifiek is, komt meer door de snelheid en de grote frequentie waarin deze beide phasen, autolysis en phagocytosis, die tot het *L. E.*-phenomeen leiden, zich afspelen. De geautolyseerde cellen vertonen als het ware een chemotaxis voor de phagocyterende granulocyten die voor het *L. E.*-celphenomeen exclusief zou zijn en niet zou plaats vinden bij andere ziekten (ROHN, BOND 1952).
Dat het uiteindelijk toch de plasma-gamma globuline-factor (Haserick-factor) moet zijn die obligaat is voor het *L. E.*-phenomeen bewijst de kruisproef, waarbij het *L. E.*-phenomeen wordt verkregen door kruising van serum of plasma van een lijder aan *L. E. D.* met een leucocytenverzameling van een normale proefpersoon.
Uit het bovenstaande wordt het duidelijk dat de tijd, verlopend tussen het afnemen van het bloed of beenmerg en de aanvang van de procedure tot vervaardiging van de preparaten, bijzonder belangrijk is en gestandaardiseerd moet zijn, want hierin vinden de twee phasen autolysis en phagocytosis plaats.
De methoden van onderzoek zijn in twee groepen te verdelen:
*a.* onderzoek in onstolbaar gemaakt bloed;
*b.* onderzoek in het gestolde bloed.
De aard van het gebruikte anticoagulans is zonder betekenis. Meestal wordt heparine gebruikt. Aanvankelijk werd juist deze heparine-techniek toegepast. De preparaten waren mooi en leucocytenrijk, echter '*L. E.*-cel' arm. In de veel minder leucocytenrijke preparaten uit het gestolde bloed blijkt, aanvankelijk tot onze verbazing, het percentage *L. E.*-cellen veel groter te zijn.
FORMIJNE (1954) kon aantonen dat het phenomeen van de phagocytosis door anticoagulantia geremd wordt. Hierdoor wordt het duidelijk dat technieken met het gestolde bloed de voorkeur verdienen.
De methoden voor het onderzoek zoals door ons werd uitgevoerd, zijn:
I. *Heparine bloed* (SCHUIT 1952)
In een steriele centrifuge-buis, waarin enkele druppels heparine (± 1 mg), wordt 5 ml veneus bloed opgevangen en gemengd. De buis blijft 30 min. bij kamertemperatuur staan tot zich een flinke plasmalaag heeft gevormd.
Nu wordt de plasmalaag met een pipet Pasteur afgezogen en in een tweede steriele centrifugebuis overgebracht. Deze wordt 45 min. bij 37° C geïncubeerd of men kan deze bij gebrek aan een stoof 2 uur bij kamertemperatuur laten staan.
Hierna wordt drie min. gecentrifugeerd op 1500 toeren. Het bovenstaande plasma wordt afgezogen en het centrifugaat wordt met een pipet Pasteur opgezogen, wordt verdeeld over enkele objectglaasjes en uitgestreken. De preparaten moeten nu enige uren drogen, worden gefixeerd in methylalcohol en gekleurd met een verdunde Giemsa of Jenner-Giemsa-oplossing.
II *a. Gestold bloed* (modificatie van de methode van ZIMMER, HARGRAVES 1952).
In een steriele centrifugebuis wordt ongeveer 5 ml veneus bloed opgevangen. Deze

buis blijft 2 uur bij kamertemperatuur staan. Hierna wordt het stolsel met een ruwe houten spatel voorzichtig gekliefd en door een fijnmazig gaas gezeefd. Het bloed dat nu van het stukgemaakte stolsel is ontdaan, wordt gedurende 5 min. bij 2000 toeren gecentrifugeerd. De bovenstaande serumlaag wordt verwijderd, de leucocytenlaag (buffy-coat) wordt samen met erythrocyten en wat serum, zoals onvermijdelijk is, afgepipetteerd en in een haematocrietbuisje (van een Westergren-buis gemaakt) overgebracht. Ook deze wordt gedurende 5 min. bij 2000 toeren gecentrifugeerd. Van de op deze wijze vervaardigde buffy-coat, na afzuiging van het bovenstaande serumlaagje, worden preparaten gemaakt en gekleurd volgens Jenner-Giemsa.

II *b. Gestold bloed* (INDERBITZIN 1954)

15 tot 20 ml veneus bloed wordt in een steriele centrifugebuis gedurende 90 tot 120 min. in een thermostaat bij 37° C geplaatst. Hierna wordt met een glasstaaf het stolsel stukgemaakt en wordt gezeefd door een fijnmazig gaas. Dit op deze wijze vervloeide stolsel wordt in een smalle lange centrifugebuis nogmaals gedurende 20–30 min. in een thermostaat bij 37° C geplaatst.

Hierna wordt 2 tot 3 min. bij 2000 toeren gecentrifugeerd.

De buffy-coat wordt uitgestreken en gekleurd als boven.

III. *Kruisproef met serum of plasma* (SCHUIT 1952)

Er wordt een leucocytenverzameling gemaakt uit het bloed van een normale persoon, door gedefibrineerd of heparinebloed direct af te centrifugeren in haematocrietbuisjes en de buffy-coat te gebruiken.

In een steriele centrifugebuis worden enkele druppels van de leucocytenverzameling gebracht, waaraan evenveel druppels van het te onderzoeken serum of plasma worden toegevoegd.

Dit late men 20 min. bij kamertemperatuur staan, waarbij geregeld even gemengd wordt. Hierna wordt gedurende 3 min. bij 1500 toeren gecentrifugeerd. Het serum kan nu worden afgezogen en van het centrifugaat worden preparaten gemaakt en gekleurd.

Het ontstaan van *L. E.*-cellen is mede afhankelijk van zekere in vitro omstandigheden en voorwaarden, waarin de tijdfactor wel de maatgevende rol speelt.

In vivo werd het *L. E.*-phenomeen nimmer in directe uitstrijken van peripheer bloed of beenmerg aangetoond.

Zou het pathologische gamma globuline, de *L. E.*-factor of Haserick-factor, in vivo niet tot werking komen?

DRUKKER (1954) daarentegen deelt mede dat hij typische *L. E.*-cellen en rozetten heeft aangetoond in het vocht dat verkregen werd door punctie van blazige huidefflorenties van een 41-jarige vrouw lijdende aan een gedissemineerde lupus erythematodes met positief *L. E.*-celphenomeen in het bloed. Hier is dus de Haserick-factor wel werkzaam in vivo, zij het niet in de grote circulatie.

Het *L. E.*-celphenomeen is een interessant, echter nog onvolledig bestudeerd verschijnsel. Hierdoor is het op dit moment raadzaam nog de nodige voorzichtigheid bij de klinische interpretatie te betrachten.

*Eigen onderzoek.*

Mede op grond van bovengenoemde overwegingen heb ik gemeend bij het onderzoek van de serumeiwitten van de gedissemineerde lupus erythematodes de volgende drie groepen te moeten onderscheiden:

*A* Groep patienten die lijdende is aan een klinisch typische lupus erythematodes disseminatus gepaard met positief *L. E.*-celphenomeen in het bloed.

Voortaan genoemd: *klinisch syndroom met positieve L. E.-celtest.*

*B* Kleine groep patienten die lijdende is aan een klinisch typische lupus erythematodes disseminatus, waarbij echter bij herhaling het *L. E.*-celphenomeen niet kon worden aangetoond.

Voortaan genoemd: *klinisch syndroom met negatieve L.E.-celtest.*

*C* Groep patienten die lijdende is aan een rheumatoide arthritis, waarbij met klinische hulpmiddelen de diagnose (vooalsnog) niet kon worden gesteld op lupus erythematodes disseminatus, doch waarbij de *L. E.*-celtest positief uitviel.

Voortaan wordt deze groep genoemd: *geen klinisch syndroom, wel positieve L. E.-celtest bij rheumatoide arthritis.*

De vraagstelling bij dit onderzoek betreft het probleem of we door electrophorese van de serumeiwitten gesteund kunnen worden bij de klinische diagnostiek van de lupus erythematodes disseminatus. Vooral in die gevallen van *suspect klinisch syndroom met negatieve L. E.-celtest* zou een steun van deze zijde immers zeer welkom zijn. De gehele groep omvat 24 patienten. Hiervan behoorden 12 tot de eerste, 5 tot de tweede en 7 tot de derde ondergroep (resp. *A*, *B* en *C*).

Een overzicht van de bevindingen wordt in de figuur op pagina 98 gegeven.

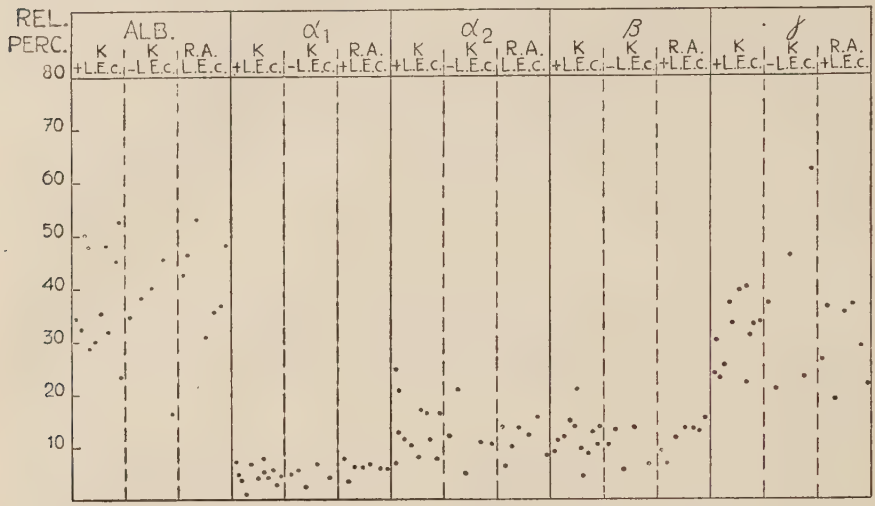
De gemiddelde waarden van de gehele groep 24 patienten met bijbehorende standaarddeviaties luiden (±):

| | gemiddelde | standaarddeviatie |
|---|---|---|
| Albumine | 38.8 | ± 9.5 |
| Alpha I | 5.3 | ± 1.7 |
| Alpha II | 12.7 | ± 4.9 |
| Beta | 11.6 | ± 3.6 |
| Gamma | 31.7 | ± 9.7 |

De gemiddelde waarden van de ondergroepen, waarbij alleen van de eerste ondergroep de standaarddeviatie wordt opgegeven, luiden:

| | Groep *A* (12) | | Groep *B* (5) | Groep *C* (7) |
|---|---|---|---|---|
| | gemiddelde | standaarddeviatie | gemiddelde | gemiddelde |
| Albumine | 38.5 | ± 9.9 | 37.– | 42.– |
| Alpha I | 5.– | ± 1.9 | 4.8 | 6.1 |
| Alpha II | 13.7 | ± 5.6 | 12.– | 11.5 |
| Beta | 11.9 | ± 4.– | 10.3 | 12.– |
| Gamma | 31.– | ± 6.3 | 37.9 | 28.4 |

In onderstaande figuur wordt een overzicht gegeven van de bevindingen bij lupus erythematodes disseminatus.




LUPUS ERYTHEMATODES DISSEMINATUS

*Vergelijking van onze uitkomsten met de resultaten van andere onderzoekers.*

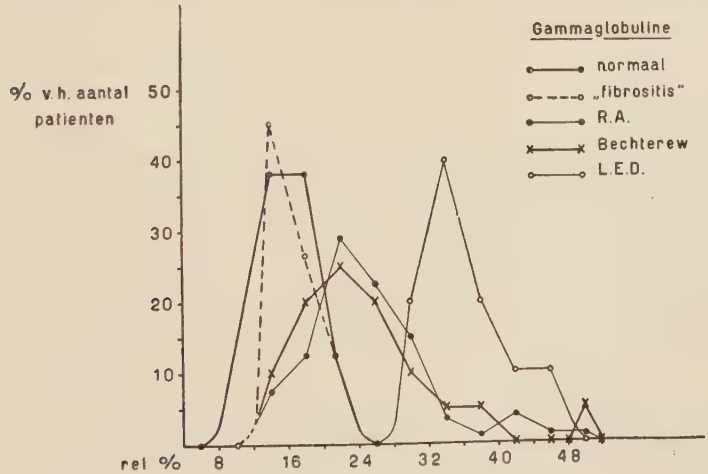
COBURN en MOORE (1943) onderzochten met behulp van Tiselius-electrophorese twee patienten lijdende aan lupus erythematodes disseminatus. Zij vonden bij beide patienten een hyperglobulinaemie, waarvan de toeneming vooral door gamma globuline veroorzaakt werd. Deze onderzoekers meenden dat een hypergamma-globulinaemie bij deze ziekte een constant en karakteristiek verschijnsel is. Op grond hiervan suggereren zij een verband tussen de vasculaire veranderingen en het circulerende gamma globuline.

REINER (1950) stelde een onderzoek in bij 20 patienten. Zij vond de volgende gemiddelde waarden (onderzocht met Tiselius-electrophorese; uitgedrukt in relatieve percenten):

| | *L.E.D.* (20) | Normaal (60) |
|---|---|---|
| Albumine | 33.4 | 56.8 |
| Alpha I | 7.3 | 7.2 |
| Alpha II | 15.4 | 8.7 |
| Beta | 12.8 | 12.8 |
| Gamma | 31.1 | 14.4 |

Zij vond dus ook een toename van gemiddelde waarden van alpha II en gamma globuline, terwijl wij eenzelfde toeneming van gamma globuline vonden, echter een kleinere toeneming van het alpha II gemiddelde. CAREY (1950) onderzocht 12

patienten en vond bij enkele patienten slechts een sterke toeneming van gamma globuline. Eén van zijn patienten had een gamma globuline van 65 rel. perc.
ROPES et al. (1954) onderzochten 7 patienten en vonden de alpha globuline-veranderingen minder sterk uitgesproken dan bij rheumatoide arthritis, terwijl de gamma globuline-stijging doorgaans in dezelfde orde van grootte lag als bij rheumatoide arthritis, uitgezonderd bij 2 patienten (39%, resp. 45%).
WALKER en BENDITT (1948) bij 9 patienten en LEVER et al. (1951) eveneens bij 9 patienten, vonden ook een lichte tot sterke gamma globuline-stijging, terwijl het alpha globuline slechts geringe verandering vertoonde.
Daarentegen delen zoals REINER (1950), ook HASERICK (1951 *a* en *b*), LEINWAND (1951), SOFFER et al. (1950 en 1951) en nu ook WALKER en BENDITT (1950) mede dat gedurende de acute phasen het alpha globuline eveneens verhoogd is.
Toen wij in Mei 1953 op de vergadering van de Nederlandsche Rheumatologen Vereeniging een voorlopige mededeling deden over de serum-electrophorese-onderzoekingen bij 10 patienten met lupus erythematodes disseminatus, vergeleken met 58 onderzoeken bij rheumatoide arthritis, 20 onderzoeken bij de ziekte van Bechterew, 10 gevallen van 'fibrositis' w.o. periarthritis humero-scapularis en 26 normalen, waren de vooruitzichten voor de klinische betekenis van de serum-electrophorese voor de diagnostiek van *L. E. D.* veel gunstiger dan deze later bij de uitbreiding van het onderzoek bleken te zijn. Deze 10 patienten waren allen onaanvechtbare klinische syndromen, waarvan toen bij 4 patienten geen *L. E.*-cellen konden worden aangetoond.
Bezien wij figuur hieronder zoals de relatieve waarden voor gamma globuline van deze groepen destijds tot uitdrukking gebracht werden, dan was het opvallend dat de *L. E. D.* duidelijk viel buiten de rheumatoide arthritis- en Bechterew-groepen. Het gamma globuline was in alle gevallen duidelijk verhoogd. In Mei 1953 werd door mij met de nodige reserve de hoop uitgesproken dat indien we een normaal tot



| | Albumine | Alpha I | Alpha II | Beta | Gamma |
|---|---|---|---|---|---|
| Normaal (50) | 64.– ± 3.11 | 3.4 ± 0.9 | 7.6 ± 1.6 | 10.– ± 1.2 | 15.– ± 2.85 |
| Verwachte grenzen | 55.6 (ondergrens) | 5.7 (bovengrens) | 12.– (bovengrens) | 13.1 (bovengrens) | 22.7 (bovengrens) |
| R.A. | | | | | |
| < 1 jr. (31) | 46.2 ± 9.2 | 6.1 ± 2.5 | 13.– ± 3.9 | 12.3 ± 2.1 | 22.4 ± 5.2 |
| licht (13) | 54.– ± 5.– | 4.7 ± 1.2 | 10.4 ± 2.8 | 11.9 ± 1.7 | 19.– ± 3.4 |
| zwaar (18) | 40.6 ± 7.2 | 7.– ± 2.7 | 14.9 ± 3.5 | 12.5 ± 2.2 | 24.9 ± 4.8 |
| R.A. | | | | | |
| 1–5 jr. (22) | 47.5 ± 8.– | 5.4 ± 1.5 | 11.4 ± 2.8 | 10.8 ± 1.8 | 26.2 ± 7.6 |
| licht (8) | 53.1 ± 4.6 | 5.3 ± 0.6 | 11.3 ± 2.1 | 11.– ± 1.8 | 19.3 ± 5.6 |
| zwaar (14) | 44.3 ± 7.4 | 5.4 ± 1.8 | 11.4 ± 3.1 | 10.7 ± 1.8 | 28.2 ± 7.3 |
| R.A. | | | | | |
| > 5 jr. (22) | 38.2 ± 7.9 | 6.1 ± 2.– | 13.– ± 3.5 | 10.2 ± 2.5 | 32.6 ± 10.9 |
| licht (5) | 39.4 ± 6.3 | 6.3 ± 1.9 | 13.7 ± 2.1 | 8.8 ± 1.1 | 31.8 ± 8.5 |
| zwaar (17) | 37.9 ± 7.3 | 6.1 ± 2.3 | 12.8 ± 3.9 | 10.6 ± 2.8 | 32.7 ± 11.4 |
| 'L.E.D.' (24) gehele groep | 38.8 ± 9.5 | 5.3 ± 1.7 | 12.7 ± 4.9 | 11.6 ± 3.6 | 31.7 ± 9.7 |
| groep A (12) kl. + L. E.-celphen. | 38.5 ± 9.9 | 5.– ± 1.9 | 13.7 ± 5.6 | 11.9 ± 4.– | 31.– ± 6.3 |
| groep B (5) kl. — L. E.-celphen. | 37.– ± 7.3 | 4.8 ± 1.6 | 12.– ± 2.– | 10.3 ± 3.8 | 37.9 ± 17.3 |
| groep C (7) R.A. + L.E.-celphen. | 42.– ± 6.7 | 6.1 ± 1.4 | 11.5 ± 3.2 | 12.– ± 3.– | 28.4 ± 6.6 |
| Bechterew (22) gehele groep | 44.7 ± 10.9 | 5.3 ± 3.– | 12.3 ± 5.1 | 11.6 ± 2.5 | 26.1 ± 10.2 |
| zonder periphere arthr. (12) | 49.8 ± 9.2 | 5.– ± 1.8 | 10.8 ± 1.5 | 11.7 ± 2.1 | 23.3 ± 8.4 |
| met periph. arthritis (10) | 39.3 ± 11.– | 5.7 ± 4.2 | 14.1 ± 7.– | 11.5 ± 2.9 | 29.4 ± 9.7 |

licht verhoogd gamma globuline zouden vinden, de diagnose *L. E. D.* onwaarschijnlijk zou worden (?).
Hieruit blijkt weer eens te meer, hoe gevaarlijk het is conclusies te verbinden aan een onderzoek van slechts een kleine groep patienten. Ook nu is de groep *A*, klinisch *L. E. D.* met positief *L. E.*-celphenomeen, nog klein. In deze groep zijn er echter nu vier met normaal of slechts licht verhoogd gamma globuline (22.–, 22.9, 24.– en 25.3 % resp.)
Bezien wij in de tabel pagina 100 de gemiddelde waarden van *L. E. D.* en rheumatoide arthritis (diverse ondergroepen) dan komen de lupus erythematodes-waarden vrij aardig overeen met de klinisch ernstige gevallen van de langer dan 5 jaar bestaande rheumatoide arthritis-groep. Aangezien de spreidingen in de verse *R. A.*-groep (korter dan 1 jaar) en in de 1–5 jaar *R. A.*-groep eveneens groot zijn en ook al zijn de gemiddelden lager dan bij de *L. E. D.*, is het duidelijk dat ook deze waarden elkaar overdekken.
Aangezien de prognose van lupus erythematodes disseminatus slecht is en onbehandeld de 5 jaar overlevingsduur slechts zelden bereikt wordt, zou dus een significant verschil met de 'korter dan 5 jaar *R. A.*'-groepen een diagnostische betekenis gehad kunnen hebben. Doch ook dit is dus niet het geval. Een laag gamma globuline sluit de lupus erythematodes disseminatus niet uit.
De mate van gamma globuline-stijging is bij al deze ziekten niet eens een betrouwbare maat voor de activiteit van de ziekte. De daling van het albumine-relatieve percentage is een betere maatstaf voor de activiteit van de rheumatische en pararheumatische ziekten, aangezien in deze daling de veranderingen van alle globulinefracties reciprook tot uitdrukking komen.
De resultaten van de onderzoeken bij groep *B*, klinisch syndroom *L. E. D.* zonder *L. E.*-celphenomeen, zijn qualitatief en quantitatief niet belangrijk verschillend van groep *A*.
Een klinisch syndroom van *L. E. D.* zonder *L. E.*-celphenomeen wordt door een normaal of sterk afwijkend – t.w. laag albumine, stijging van alpha en/of gamma globuline – serum-electrophoresebeeld noch in positieve noch in negatieve zin diagnostisch bekrachtigd.
De groep van 7 patienten lijdende aan een rheumatoide arthritis, zonder enig teken dat vooralsnog wijst op *L. E. D.*, waarbij tot onze verrassing (6 patienten uit de kliniek van Prof. Goslings) het *L. E.*-celphenomeen werd aangetoond, biedt van serum-electrophoretisch standpunt geen nieuwe aspecten. Het alpha II globuline was 3 maal licht verhoogd, het gamma globuline was 2 maal normaal, 2 maal licht verhoogd (26.7 en 28.3 %) en 3 maal duidelijk verhoogd (31.8, 35.3 en 36.7 %). Deze veranderingen zijn ook weer qualitatief en quantitatief niet verschillend van de rheumatoide arthritis. De kwestie der specificiteit van het *L. E.*-celphenomeen (zie blz. 91), wordt door onze onderzoekingen van de serumeiwitten niet nader belicht of verhelderd.
De diagnostische betekenis van de serumeiwit-electrophorese-patronen bij rheumatische en para-rheumatische ziekten is even miniem als de linksverschuiving in het periphere bloedbeeld bij infectieuze ziekteprocessen. Als maatstaf voor de activi-

teit van deze ziekten is het een betrouwbare, doch toch nog omslachtige methode, aangezien de bezinking ons hierover zeer goed inlicht op eenvoudiger wijze.

### *c* DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ PERI-ARTERIITIS NODOSA, DIFFUSE SCLERODERMIE EN DERMATO-MYOSITIS. ENKELE EIGEN WAARNEMINGEN.

*Peri-arteriitis nodosa*

Door KAGAN (1943) en SOLOMON et al. (1944) werd bij peri-arteriitis nodosa hyperglobulinaemie waargenomen.

LEPOW et al. (1949) vonden dat het serum van een patient dat gedurende 24 uur bij 4° C was bewaard een spontane precipitatie vertoonde van een eiwit dat zich electrophoretisch als een gamma globuline gedroeg. Het verschilde van het cryoglobuline in die zin dat het bij kamertemperatuur niet weder in oplossing ging. ROEGHOLT en VAN GOOL (1954) delen mee bij een lijdster aan peri-arteriitis nodosa in het serum een in de koude precipiterend eiwit gevonden te hebben dat gedeeltelijk weer oploste bij 37° C in de broedstoof en gedeeltelijk zich gedroeg als het door LEPOW et al. gevonden eiwit en niet bij 37° C weer in oplossing ging. Ook deze eiwitten gedroegen zich electrophoretisch als gamma globuline.

*Eigen onderzoek* van 4 patienten lijdende aan peri-arteriitis nodosa en van één patient met een cutane vorm van peri-arteriitis nodosa.

| Naam | Albumine | Alpha I | Alpha II | Beta | Gamma | Tot. eiwit gr. % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Si. | 29.5 | 10.7 | 22.4 | 15.4 | 22.– | 7.22 |
| Sch. | 46.8 | 9.– | 11.– | 12.– | 21.1 | 7.06 |
| Fe. | 42.9 | 6.9 | 15.8 | 13.6 | 20.8 | 5.97 |
| Be. | 40.6 | 6.1 | 12.7 | 14.– | 26.6 | 7.88 |
| Wa. (cutane vorm) | 52.3 | 5.7 | 13.6 | 14.7 | 13.7 | 7.20 |

Opvallend is dat het gamma globuline in deze gevallen normaal of slechts in één geval licht verhoogd was. Het geval van ROEGHOLT en VAN GOOL had een gamma globuline van 23 rel. perc.

De opmerking van EHRICH (1953) dat de verhoging van het gamma globuline de opvatting steunt dat peri-arteriitis nodosa een allergische ziekte is, gaat naar mijn mening veel te ver. Niemand zal ontkennen dat peri-arteriitis nodosa een allergische ziekte is, doch men dient dit niet te motiveren op grond van een verhoogd gamma globuline.

Uit de quantitatieve veranderingen van de serumeiwit-fracties putte men nimmer kracht voor een aetiologische verklaring van een ziekte-beeld! In de literatuur vindt

men echter telkens suggesties in dit opzicht (DONZELOT 1949 *a* en *b*). Evenzo is de uitspraak van WALLIS (1950), zoals reeds op blz. 67 vermeld, dat de hypergamma globulinaemie van rheumatoide arthritis in hoofdzaak door hyperimmuniteit wordt veroorzaakt, te enen male onjuist. Omgekeerd mogen we zeggen dat ook al is het gamma globuline quantitatief normaal of slechts licht verhoogd, dit een qualitatief abnormaal eiwit zeker niet uitsluit.
In het geval van ROEGHOLT en VAN GOOL bleek ruim 60% van het gamma globuline een in de koude neerslaand eiwitlichaam te zijn.
De globuline-toeneming bij deze gevallen van peri-arteriitis nodosa werd vooral door vermeerdering van het alpha globuline veroorzaakt.

*Diffuse en circumscripte sclerodermie*
WALKER en BENDITT (1948) vonden bij 5 gevallen van diffuse sclerodermie een hypoproteinaemie, hypoalbuminaemie en hypergammaglobulinaemie. Zij vonden als relatieve gemiddelden: Albumine 47.7%, gamma globuline 21.6%. De veranderingen bij één geval van circumscripte sclerodermie waren ongeveer gelijk. De alpha en beta globulinen waren in alle gevallen normaal.
De resultaten van onze eigen gevallen, 4 maal diffuse sclerodermie en 2 maal circumscripte sclerodermie, luiden:

| Nm | Ziekte | Albumine | Alpha I | Alpha II | Beta | Gamma | Tot. eiwit gr. % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sn. | Syndroom van Thibierge-Weissenbach | 46.7 | 4.2 | 11.6 | 11.– | 26.5 | 7.53 |
| Lo. | diff. sclerodermie | 48.3 | 5.– | 7.2 | 11.1 | 28.4 | 7.66 |
| Me. | diff. sclerodermie | 39.2 | 3.5 | 13.7 | 10.6 | 33.– | 7.53 |
| Vi. | diff. sclerodermie | 52.5 | 5.7 | 11.8 | 11.3 | 19.– | 5.93 |
| Wi. | ziekte van Werner | 54.1 | 7.5 | 10.1 | 10.8 | 17.5 | 7.40 |
| Zw. | circumscripte vorm | 61.– | 3.1 | 8.3 | 11.2 | 16.4 | 7.71 |

De drie gevallen met verhoging van het gamma globuline waren langer dan 15 jaar bestaande gevallen in extreem stadium. Pate Vi. was een jonge vrouw die ongeveer een jaar symptomen van diffuse sclerodermie vertoonde. De twee gevallen van circumscripte sclerodermie vertoonden electrophoretisch een normaal gamma globuline.

*Dermatomyositis*
O'LEARY en WAISMAN (1940) vonden, dat de totale eiwitwaarden bij dermatomyositis aan de lage kant waren, terwijl zij normale albumine-globulinequotienten vonden (Howe). Zoals reeds tevoren vermeld (blz. 33) sluit dit een lichte globulinevermeerdering niet uit.

KINNEY en MAHER (1940) vonden bij één van hun gevallen een hyperglobulinaemie.
WALKER en BENDITT (1948) onderzochten 4 patienten en vonden geringe afname van albumine en geringe toename van gamma globuline.
LEVER, SCHULTZ en HURLEY (1951) vonden bij 2 patienten een lichte toename van alpha I en alpha II globuline.
LEINBROCK (1952) deelt één geval mee van poikilodermato-myositis met een hyperproteinaemie, variërend van 8.3–9.8 gr %, gamma globuline-verhoging variërend van 45–52 rel. %, en hypalbuminaemie variërend van 25–30 rel. %, in een observatietijd van $1\frac{1}{2}$ jaar.
ROPES et al. (1954) onderzochten 4 patienten met dermato-myositis. Zij vonden normaal alpha I, licht verhoogd alpha II en fibrinogeen, 2 maal licht verhoogd gamma en 2 maal een daling van albumine rel. percentages.
Bij het eigen onderzoek waren geen patienten die lijdende waren aan dermato-myositis, zodat ik volsta met de gegevens uit de literatuur te vermelden.

# VIII

## EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ ENKELE ANDERE GEWRICHTSZIEKTEN.

EIGEN ONDERZOEK VAN DE SERUMEIWIT-VERANDERINGEN BIJ ENKELE ANDERE GEWRICHTSZIEKTEN.

| Nm | Diagnose | Albumine | Alpha I | Alpha II | Beta | Gamma | Tot. eiwit gr. % | B.S.E. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| To. | *arthritis urica* (chron.) | 44.9 | 3.8 | 11.9 | 11.9 | 27.5 | 7.54 | |
| Zu. | arthritis urica (chron.) | 51.2 | 7.8 | 11.2 | 8.3 | 21.5 | | 15/35 |
| Le. | *arthritis psoriatica* | 46.7 | 4.2 | 11.5 | 12.2 | 26.5 | 8.26 | 29/56 |
| Mu. | *polyarthritis mutilans* | 50.2 | 8.1 | 14.3 | 13.4 | 13.4 | 6.91 | 65 |
| Wi. | *polyarthrosis* (gegeneraliseerde osteoarthritis Heberden) | 50.2 | 3.7 | 12.2 | 10.3 | 23.5 | 7.7 | 11 |
| Wa. | „ „ | 58.4 | 5.8 | 7.2 | 9.7 | 18.9 | | 42 |
| On. | „ „ | 48.5 | 2.1 | 14.4 | 12.8 | 22.2 | 6.85 | 28/65 |
| Wo. | „ „ | 61.3 | 5.2 | 7.2 | 10.7 | 15.6 | 6.83 | 28/51 |
| Zij. | „ „ | 53.1 | 4.6 | 13.9 | 13.4 | 15.– | 6.85 | 28/60 |
| To. | „ „ | 59.7 | 3.7 | 8.6 | 10.9 | 17.1 | 7.32 | 6/15 |
| Ge. | *hydrops intermittens genu* | 58.– | 4.– | 14.1 | 8.5 | 15.4 | 7.79 | 9 |
| Ko. | „ „ | 47.5 | 6.2 | 9.6 | 11.9 | 24.8 | 7.50 | 13/34 |
| Gi. | *periarthritis humeroscapularis* | 49.5 | 6.5 | 15.5 | 13.– | 15.5 | | 44 |
| Try | „ „ | 52.6 | 3.3 | 12.4 | 10.6 | 21.1 | 7.18 | 17 |
| Gli. | *syndroom van Sjögren met rheum. arthritis* | 57.3 | 5.– | 6.7 | 9.6 | 21.4 | 6.84 | 10/26 |
| Ru. | „ „ | 44.2 | 5.8 | 13.4 | 8.8 | 27.7 | 8.10 | 46/77 |
| Co. | „ zonder rheum. arthritis | 38.6 | 6.9 | 8.9 | 13.5 | 32.1 | 8.35 | |

*Bespreking van de resultaten*

*a.* De twee gevallen van jicht (urinezuurgehalte resp. 6,2 en 6.4 mg %) verlopen onder het beeld van de chronische polyarthritis met tophi. De electrophoresediagrammen van de sera tonen een zelfde beeld als bij rheumatoide arthritis kan worden gevonden.

Dat bij de tweede patient, ondanks het chronisch verloop, het gamma globuline nor-

maal blijft, mag niet beschouwd worden als een differentieel diagnosticum tegenover de rheumatoide arthritis.

*b.* Het beeld van de arthritis psoriatica onderscheidt zich klinisch van de 'rheumatoide arthritis met psoriasis' in zo verre, dat hierbij de distale interphalangeale gewrichten van de vingers destructieve veranderingen vertonen. Het serum-electrophorese-diagram vertoont hier weer een beeld zoals dat bij de rheumatoide arthritis gevonden kan worden.

*c.* Onder polyarthritis mutilans (STURSBERG 1935) wordt een beeld verstaan, dat als een variant is te beschouwen van rheumatoide arthritis en dat gekenmerkt is door zeer ernstige destructie, waarbij niet alleen de epiphysen maar ook de diaphysen betrokken kunnen zijn. Vrijwel typerend voor deze ziekte is het spitse, conische toelopen van de distale ulna diaphyse met verdwijning van de epiphyse. Opvallend is de sterke destructie van de kopjes van de metacarpalia. Vele gewrichten vertonen een zeer ernstige destructie, zo ook van de wervelkolom, die vrijwel geheel gefixeerd kan zijn. Een protusio acetabuli wordt in deze gevallen nogal eens beschreven. Dit ziektebeeld was echter reeds sinds 1913 bekend, toen MARIE en LERI een geval mededeelden van een 70-jarige vrouw met sterke destructie van de vingergewrichten. Zij had reeds 28 jaar een ernstige polyarthritis van ellebogen, schouders, heupen en wervelkolom. De ernstige beenabsorptie van de handen ter plaatse van de metacarpophalangeale en interphalangeale gewrichten gaf aanleiding tot verkorting van de vingers. Hierdoor ontstonden dwarsplooien van de huid van de handen, waardoor deze gingen gelijken op een in elkaar geschoven ouderwetse toneelkijker. Op grond hiervan beschreven zij het beeld als 'la main en lorgnette' of 'doigt en lorgnette' (MARIE en LERI 1913).

De gevallen die van deze ziekte beschreven zijn (MARIE en LERI 1913, WEIGELDT 1929, STURSBERG 1935, NELSON 1938, CRAIN 1941, NIELSEN en SNORRASON 1946, en SMYTH 1952) werden steeds gevonden na een zeer langdurige polyarthritis, met een gemiddelde ziekteduur van 24 jaar voordat het karakter van de osteoarthropathia mutilans en 'la main en lorgnette' werd waargenomen.

Het door ons waargenomen geval van polyarthritis mutilans had ruim 20 jaar gewrichtsafwijkingen. Niettegenstaande was het relatieve gamma globuline normaal (13.4 rel. perc.). Het alpha globuline was verhoogd.

*d.* De serum-electrophorese-diagrammen van de polyarthrosis (gegeneraliseerde osteo-arthritis) vertonen slechts geringe veranderingen: het gamma globuline was slechts eenmaal licht verhoogd. (23.5 rel. %), het alpha globuline was tweemaal licht verhoogd.

Voor de differentiële diagnose tussen polyarthrosis en rheumatoide arthritis is een normaal electrophorese-diagram geen steun in de richting van polyarthrosis. De kliniek is ook hier weer het belangrijkste. Wordt een sterk verhoogd gamma globuline gevonden dan wordt een polyarthrosis wel onwaarschijnlijk, maar dan zullen de klinische verschijnselen ons stellig niet doen twijfelen aan de juiste diagnose. Maar juist in die gevallen waarbij het moeilijk is of we met een lichte rheumatoide arthritis of een polyarthrosis te doen hebben, brengt dit laboratorium-onderzoek ons niet verder.

Opvallend is dat bij enkele van deze waarnemingen de bezinkingssnelheid duidelijk verhoogd werd waargenomen, zodat men met de zoveel gepubliceerde stelling dat de polyarthrosis een normale bezinking moet hebben, ook al weer voorzichtig moet zijn.

*e.* en *f.* Hetzelfde als voor de polyarthrosis hierboven werd gezegd, geldt voor de hydrops intermittens genu en de periarthritis humero-scapularis.

*g.* Het syndroom van Sjögren behoeft niet, maar kan gepaard gaan met een hypergammaglobulinaemie. ESSER en SCHMENGLER (1951) onderzochten 4 gevallen en vonden hyperproteinaemie, hypoalbuminaemie en hypergammaglobulinaemie. Bij onze drie gevallen hadden twee patienten een lichte hyperproteinaemie, duidelijke hypoalbuminaemie en hypergammaglobulinaemie.

De eerste patient had een volkomen normaal diagram.

# IX

*a* DE VERANDERINGEN VAN DE BLOEDEIWIT-FRACTIES DOOR BEHANDELING MET ADRENOCORTICOTROOP-HORMOON EN CORTISON.

*b* EIGEN ONDERZOEK VAN DE VERANDERINGEN VAN DE SERUM-EIWITTEN ONDER INVLOED VAN DE BEHANDELING MET A.C.T.H. BIJ LIJDERS AAN RHEUMATOIDE ARTHRITIS EN ZIEKTE VAN BECHTEREW.

## *a* DE VERANDERINGEN VAN DE SERUMEIWIT-FRACTIES DOOR BEHANDELING MET ADRENO CORTICOTROOP-HORMOON (CORTICOTROPHINE) EN CORTISON

Zoals reeds in hoofdstuk IIIc, betrekking hebbend op de invloed van *A. C. T. H.* en cortison op de productie van antilichamen, werd beschreven hebben verschillende onderzoekers aangetoond dat onder invloed van deze hormoontherapie de vorming van antilichamen geremd kan worden, terwijl tevens door een grote reeks onderzoekers werd aangetoond dat een daling van het verhoogde gamma globuline een gevolg van de hormoontherapie is.

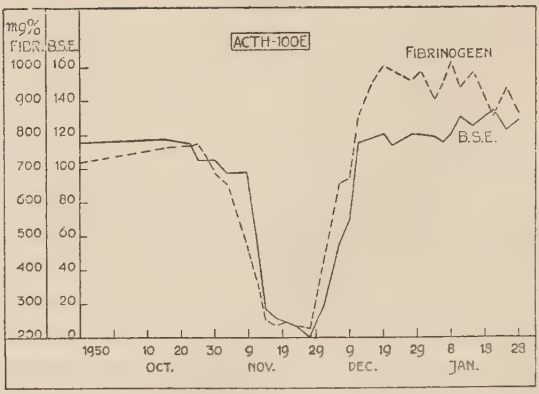
HENCH, KENDALL, SLOCUMB en POLLEY (1949) deelden mede toen zij het dramatisch effect van cortison en *A. C. T. H.* op het beloop van rheumatoide arthritis bekend maakten, dat er een snelle daling van de bezinkingssnelheid optrad tijdens een remissie, terwijl deze wanneer de toediening van deze hormonen werd gestopt, wederom steeg.

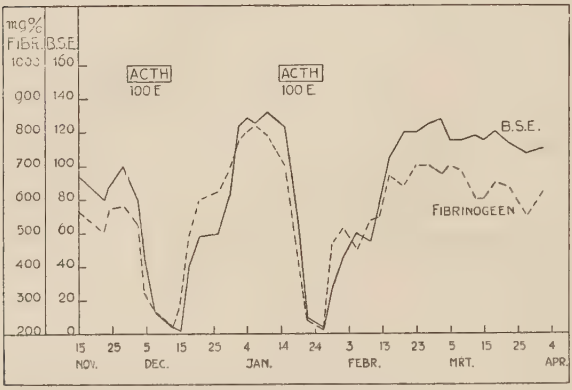
VAUGHAN, BAYLES en FAVOUR (1950) deelden een jaar later mee, dat gedurende deze remissie, een daling ontstond van het fibrinogeen van het bloedplasma, welke daling nauw zou samen gaan met de daling van de bezinkingssnelheid. Deze onderzoekers vonden tevens een daling van het gamma globuline, maar deze daling was langzamer en begon doorgaans 5 tot 7 dagen na de fibrinogeendaling. In een ander artikel concludeerden deze onderzoekers (1951) dat de daling van fibrinogeen en gamma globuline aansprakelijk is voor de daling van de bezinkingssnelheid.

FISCHEL (1951) meent dat de dalingen van fibrinogeen en gamma globuline door deze hormoonbehandeling niet een primair effect van het hormoon op deze eiwitten behoeft te zijn, maar acht het waarschijnlijker dat de veranderingen een afspiegeling zijn van het effect van deze hormonen op het ontstekingsproces waaruit de daling van deze eiwitten resulteert. REINER (1950), CAREY et al. (1950) en BERGLUND et al. (1951) namen dalingen waar van het gamma globuline tijdens de hormoontherapie; BERGLUND et al. (1951) zagen dat het gamma globuline later begon te dalen en langer doordaalde dan de bezinkingssnelheid. Deze onderzoekers constateerden tevens een daling van de plasmacellen-hyperplasie in het beenmerg en suggereren dat wanneer door cortison en *A .C. T. H.* de plasmacellen-hyperplasie teruggaat, hierdoor secundair een daling van het gamma globuline ontstaat. De plasmacellenconcentratie gaat onder *A. C. T. H.* snel naar beneden, terwijl het gamma globuline en enkele immunologische serologische reacties langzamer teruggaan. Dit zou te verklaren zijn omdat de halveringstijd van antilichaam-eiwitten ongeveer 14 dagen is (SCHOENHEIMER et al. 1942).

Het effect van *A. C. T. H.* of cortison op de bezinkingssnelheid en het fibrinogeengehalte van het bloedplasma van lijders aan rheumatoide arthritis werd bestudeerd door FLETCHER, DAUPHINEE en OGRYZLO (1952).

Deze onderzoekers vonden een sterke paralleliteit in het verloop van het fibrinogeengehalte en de bezinkingssnelheid, zoals uit de resultaten bij 2 patienten in de figuren op pagina 114 duidelijk is. De bezinkingssnelheden zijn hier zo uitgezet dat 100 mm van de Westergren-bezinking correspondeert met een fibrinogeenconcentratie van




700 mg %, terwijl het nulpunt van de bezinking correspondeert met een fibrinogeengehalte van 200 mg %.

De correlatie is in grote trekken opvallend. Boven de 100 mm correleert de bezinkingssnelheid niet meer met de hoge fibrinogeenwaarden. Zowel tijdens de remissie door *A. C. T. H.* of cortison als tijdens de rechute na het stoppen van de hormoonbehandeling gaat de daling resp. stijging van het fibrinogeen één tot twee dagen vooraf aan de veranderingen van de bezinkingssnelheid. Dat hier een nauw verband werd gevonden tussen fibrinogeengehalte en bezinkingssnelheid is niet verwonderlijk, daar het fibrinogeen van de plasma-eiwitten de belangrijkste factor is die de bezinkingssnelheid bepaalt. Toch is deze paralleliteit slechts mogelijk wanneer de globulinefractie van het serum een zelfde verloop vertoont. In onze eigen onderzoekingen wordt het verband tussen de bezinkingssnelheid en de electrophoretische globulinefracties bestudeerd.

FAHREUS (1929) vond reeds een opvallende overeenkomst tussen bezinkingssnelheid en fibrinogeen-concentratie.

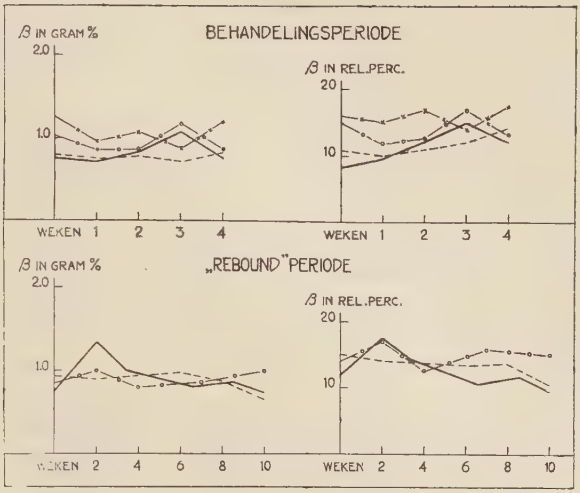
HAM en CURTIS (1938 *b*) toonden aan dat er een lineaire correlatie bestaat van de fibrinogeen-concentratie met de bezinkingssnelheid mits het serumglobuline en het gemiddelde celvolumen binnen de normale grenzen zijn.

GRAY en MITSCHELL (1942) vonden dat het verhogend effect van fibrinogeen op de bezinkingssnelheid ongeveer zesmaal zo groot is als dat van het serumglobuline.
HARDWICKE en SQUIRE (1952) delen mee, dat 1 gram fibrinogeenvermeerdering per 100 ml de bezinkingssnelheid (gecorrigeerd voor plasmaviscositeit en soortelijk gewicht der erythrocyten) 10 maal vermeerdert, terwijl één gram vermeerdering van alpha II resp. gamma globuline dit 5 maal resp. 2 maal doen.
In de onderzoekingen van FLETCHER et al. wordt tevens aangetoond dat na het stoppen van de hormoonbehandeling een stijging van bezinkingssnelheid en fibrinogeenconcentratie optreedt, waarvan de laatste zelfs waarden bereikt die 50% liggen boven de uitgangswaarden. In het algemeen gingen de fibrinogeenconcentraties geheel parallel met de clinische activiteit van de rheumatoide arthritis. Deze onderzoekers gingen wel de veranderingen van het euglobuline van het serum, echter niet van de electrophoresefracties van het serum na onder invloed van *A. C. T. H.* en cortison. De daling van het euglobuline was langzamer dan van fibrinogeen en ging door, nadat de behandeling gestaakt was en de klinische 'rebound' was ingetreden. Zij suggereren dat er reden is aan te nemen dat de euglobulinesynthese door deze hormoontherapie door het anti-anabool effect onderdrukt wordt, terwijl het verloop van het fibrinogeengehalte zo nauw correleert met de klinische activiteit, dat het waarschijnlijker is dat de veranderingen van de fibrinogeenconcentratie een resultante zijn van de veranderde klinische toestand en niet primair op een anti-anabool effect behoeven te wijzen.

### *b* EIGEN ONDERZOEK VAN DE VERANDERINGEN DER SERUMEIWITTEN ONDER INVLOED VAN DE BEHANDELING MET *A. C. T. H.* BIJ LIJDERS AAN RHEUMATOIDE ARTHRITIS EN ZIEKTE VAN BECHTEREW

Toen in de jaren 1952 en 1953 op grond van de grote verwachtingen een grote groep lijders aan rheumatoide arthritis en de ziekte van Bechterew, met adrenocorticotroop-hormoon werden behandeld, was het mogelijk in die tijd bij een serie patienten de serumeiwit-veranderingen te vervolgen. Ik zou ook zeker de verkregen resultaten met name de significante dalingen van het gamma globuline, op deze plaats hebben medegedeeld, ware het niet aan het licht gekomen, dat de klinische werkzaamheid van diverse *A. C. T. H.* preparaten bijzonder sterke verschillen vertoonde, zoals door GOSLINGS et al. (1954 *a*) werd aangetoond aan de hand van de 17 ketosteroiden uitscheiding in de 24-uurs-urines. De ijking van het *A. C. T. H.* preparaat volgens de Sayers-test blijkt n.l. niet overeen te komen met een klinische ijking.
Aangezien bij de behandeling van deze patienten niet alleen verschillende doseringen werden toegepast, echter ook verschillende 'charges' van *A. C. T. H.* preparaten werden gegeven, die onderling verschillend klinisch werkzaam waren in dezelfde 24-uurs-dosering, is het duidelijk dat een vergelijkend onderzoek bij deze op deze wijze met *A. C. T. H.* behandelde patienten, weinig zin heeft.
Derhalve volsta ik met de gegevens te vermelden van vier patienten die op

uniforme wijze met hetzelfde preparaat werden behandeld. Hiertoe maakte ik gebruik van het Organon cortrophine preparaat dat aldaar bekend staat als charge 37*A*.
Drie patienten lijdende aan actieve rheumatoide arthritis en één patient, lijdende aan de ziekte van Bechterew in extreem stadium, werden bestudeerd. Aangezien cortrophine Organon, charge 37 *A* een bijzonder sterk klinisch werkzaam preparaat was gebleken, werden deze patienten behandeld met een zeer lage dosering van 12 eenheden per dag, verdeeld over zes injecties van 2 *E* (6 × 2 *E* p.d.).
De bloedmonsters voor electrophorese en bezinkingssnelheid werden volgens standaardcondities afgenomen (steeds nuchter en op hetzelfde uur van de dag), waarbij werd zorg gedragen dat zo kort mogelijk werd gestuwd bij de venapunctie.
De bepaling der 17 ketosteroiden in de 24-uurs-urine werd verricht op het laboratorium van Dr. A. A. H. Kassenaar van de endocrinologische afdeling van Prof. Dr. A. Querido te Leiden.
De veranderingen van de serumeiwit-fracties van 4 op bovenbeschreven wijze behandelde patienten, werden steeds samengevoegd, zodat steeds op één figuur de veranderingen van één eiwitfractie zijn samengebracht van vier patienten. De 24-uurs-uitscheiding van de 17 ketosteroiden werd uit het oogpunt van uniformiteit eveneens in curve gebracht. In deze curven werd het percentage stijging van de 17 ketosteroiden uitscheidingen in de 24-uurs-urines uitgedrukt tegenover het gemiddelde van drie waarden, die voor de behandeling werden gevonden.
Het verloop van de serumeiwit-fracties werd zowel in absolute als relatieve waarden, in naast elkaar geplaatste figuren, tot uitdrukking gebracht.
Hoewel enerzijds de absolute veranderingen het belangrijkst zijn moeten wij anderzijds ook beseffen dat door de waarden op te geven in absolute maat, als gram eiwit per 100 ml serum, niet de zuivere eiwitconcentratie-veranderingen tot uiting komen, maar de mate van haemodilutie c.q. haemoconcentratie door de *A. C. T. H.* behandeling hierop eveneens zijn invloed kan doen gelden.
Derhalve werden ook de relatieve waarden in curve gebracht. Hierin echter zal bij voorbeeld een solitaire verandering van de albumine-concentratie een evenredig verdeelde compensatoire verandering van de globuline-fracties geven, waardoor een vertrokken beeld ontstaat en geen juiste indruk over de ware aard van de primaire verandering(en) wordt verkregen.
Het feit dat het beta globuline bij rheumatoide arthritis normaal is en ook normaal blijft bij toe- of afname van de activiteit van het proces, is een gelukkige omstandigheid omdat het ons nader kan inlichten in hoeverre de corticotrophine-behandeling door haemidilutie een onjuist beeld geeft van de serumeiwit-veranderingen, uitgedrukt in absolute maat.
Bezien we de figuren op de volgende pag. waarin het verloop van het beta globuline, bij 4 patienten gedurende de behandeling met cortrophine Organon (charge 37 *A*), en bij drie patienten tijdens de klinische rebound na het stoppen van de behandeling werd vervolgd, dan valt op dat de veranderingen in de relatieve en absolute curven parallel gaan.
Ook in de curven van alpha en gamma globuline (figuren pag. 118 en 120) is de

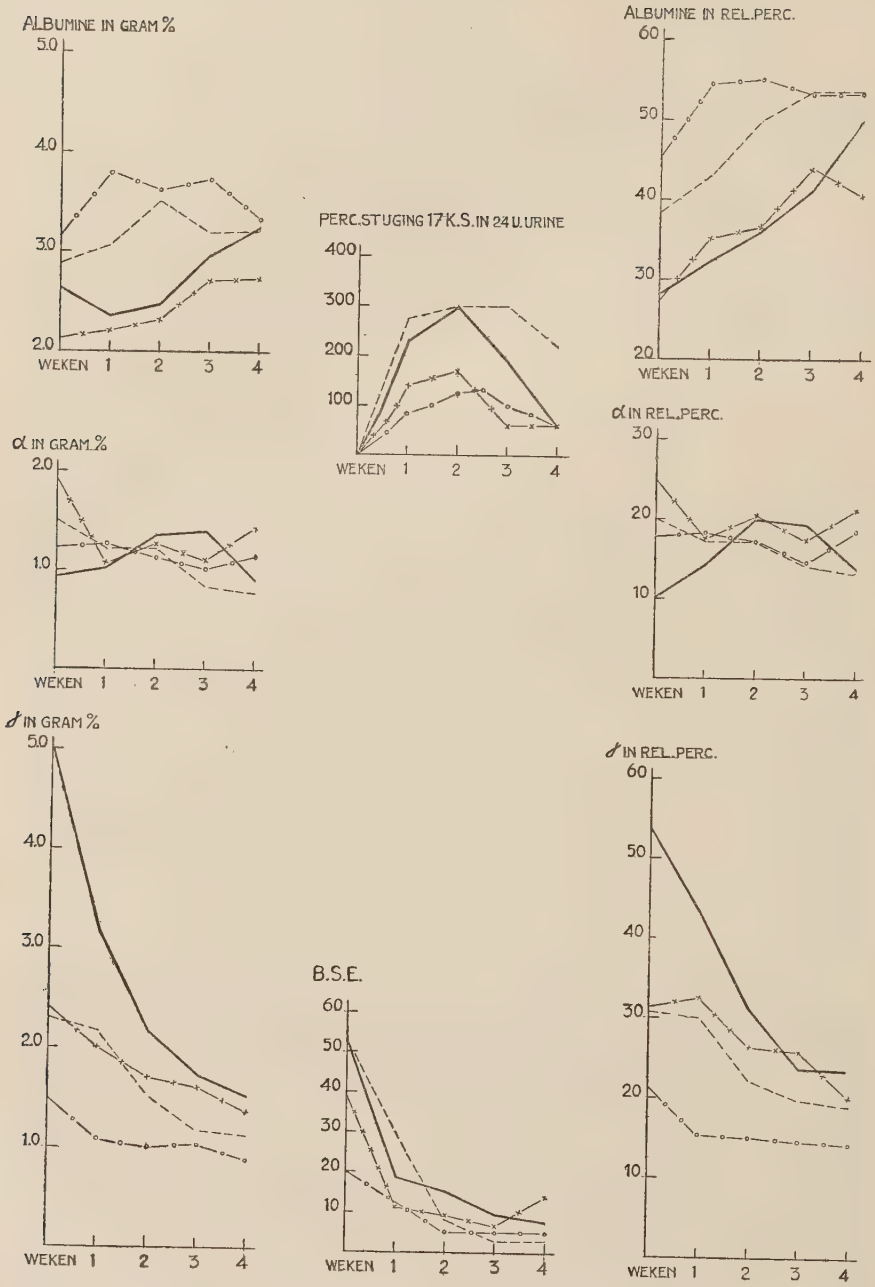



paralleliteit opvallend groot. Hieruit blijkt wel dat zowel de relatieve curve als de absolute curve beide een goed beeld geven van de veranderingen.
In de albuminecurven is de overeenkomst op vele plaatsen niet goed. Hieruit zouden we kunnen concluderen, dat de albuminefractie van het plasma niet primair verandert door de corticotrophine-behandeling. De stijging van het 'relatieve albumine' berust in die bepalingen, waar het 'absolute albumine' onveranderd blijft of daalt, op een relatief effect, zoals boven werd uiteengezet, door daling van alpha en (of) gamma globuline.
Bij deze methode van onderzoek is de invloed van haemodilutie door corticotropphine niet merkbaar geweest.
We doen dus bij de beoordeling van de resultaten het beste uit te gaan van de absolute curven.

*Bespreking van de resultaten*

I. *Behandelingsperiode* (zie pagina 118)
*a*. De vier patienten die werden behandeld met lage doses van hetzelfde cortrophine Organon (charge 37 A), 6 *dd* 2 *E*, vertoonden in de drie gevallen van beginnende rheumatoide arthritis (I, II en III) een volkomen klinische remissie. De vierde patient – extreem geval van de ziekte van Bechterew – verbeterde opvallend zowel subjectief als objectief. In de vierde week ontstonden tijdens de behandeling bij twee van de rheumatoide arthritis patienten (II en III) duidelijke verschijnselen van toename van de activiteit, in objectieve maat aantoonbaar. Deze laatste vertoonden dan ook een geringere toename van de 17 ketosteroiden uitscheidingen. Voor deze patienten was 12 *E* cortrophine te weinig.
*b*. De stijging van de 17 ketosteroiden uitscheiding in de 24-uurs-urine, uitgedrukt in percentagestijging en vergeleken met het gemiddelde van drie vóór-waarden,

BEHANDELINGSPERIODE

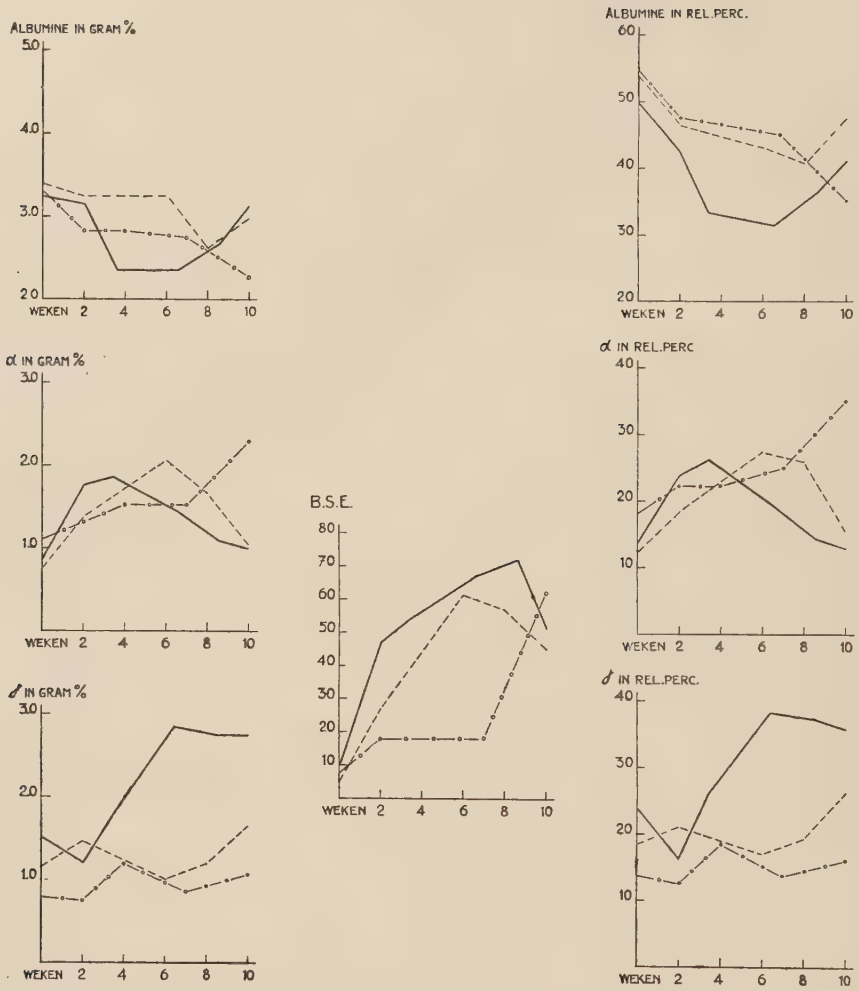



– – – – patient I o-o-o-o patient II x–x–x–x patient III ——— patient IV

was bij de twee patienten die na 4 weken op deze lage dosis nog goed waren (I en IV), duidelijk hoger dan bij de bovengenoemde patienten (II en III).
*c.* De bezinkingssnelheid daalde in de derde week tot normale waarden.
*d.* Het alpha globuline daalt bij patient I geleidelijk tot normaal. Bij patient III is na een aanvankelijke daling weer een stijging te zien (gecombineerd met toename van fibrinogeen van 0.300 tot 0.500 gr %). Dit ging gepaard met enige toename van de klinische activiteit van het proces. Nadat het alpha globuline in de derde week bij patient II tot de norm was gedaald, stijgt dit weer in de vierde week, gepaard met klinische verergering en mede aandoening van een gewricht dat vóór de behandeling nog normaal was (hydrops linkerknie). Bij patient IV is bij de aanvang het alpha globuline zeer laag en stijgt iets tijdens de behandeling tot even boven normaal.
*e.* Het gamma globuline daalt sterk bij patient IV; bij I en III daalt het geleidelijk tot normale waarden; patient II had vóór de behandeling een vrijwel normaal gamma globuline, dat tijdens de behandeling nog verder daalt. De sterke daling na twee weken bij patient IV, is moeilijk te begrijpen als de overlevingsduur van antilichaam gamma globuline 2 weken zou zijn (zie blz. 113) zoals werd aangetoond door SCHOENHEIMER, RATNER en RITTENBERG (1942). Dit is weer eens een reden te meer om gamma globuline niet te vereenzelvigen met antilichaam-eiwitten. De mening van VAUGHAN et al. (1950) en BERGLUND et al. (1951) dat het gamma globuline in de eerste weken tijdens de behandeling onveranderd zou blijven, kon door ons onderzoek niet worden bevestigd.
Bij drie patienten die vóór de behandeling een verhoogd gamma globuline hebben, is dit na 4 weken behandeling geheel normaal.
Het aantal plasmacellen in het beenmerg daalde bij patient III tijdens de behandeling van $17^0/_{00}$ tot $5^0/_{00}$. Aangezien aan deze plasmacellen een rol wordt toegedacht bij de productie van gamma globuline is deze waarneming nog vermeldenswaard.

II *'Rebound'-periode, na het beëindigen van de corticotrophine-behandeling*
*(zie pagina 120)*
(Aangezien patient III niet langer klinisch vervolgd kon worden na beëindiging van de therapie, valt deze hierbij uit)
*a.* De subjectieve en objectieve verschijnselen nemen na het stoppen van corticotrophine zo sterk toe, dat het proces aanvankelijk in de 'rebound'-periode bij deze drie patienten nog actiever was dan voor de behandeling.
*b.* De 17 ketosteroiden uitscheiding was in deze periode weer tot de uitgangswaarde gedaald.
*c.* De bezinkingssnelheid stijgt tot ver boven de uitgangswaarden.
*d.* Ook het alpha globuline stijgt ver boven de uitgangswaarden. Ook hier is er wederom verband tussen de stijging van alpha globuline en de klinische activiteit van het proces. Ook blijkt er overeenkomst tussen de bezinking en het alpha globuline. Bij patient IV lijkt dit ook in de eerste weken, waarna het wordt overgenomen door het gamma globuline.
SHEDLOWSKI en SCUDDER (1942) deelden mede dat bij verschillende ziekten

„REBOUND" PERIODE




– – – – patient I o–o–o–o patient II ——— patient IV

een correlatie bestaat tussen bezinkingssnelheid en fibrinogeen enerzijds en alpha globuline anderzijds.

LÖVGREN (1945) vond dat een daling of stijging van het alpha globuline parallel ging met daling of stijging van fibrinogeen. Dit werd onderzocht bij verschillende ziekten.

*e.* Het gamma globuline blijft nog ± 2 weken na het beëindigen van de corticotrophine-behandeling op hetzelfde lage niveau, om hierna weer te stijgen. De uitgangswaarden werden echter bij deze patienten na 10 weken niet bereikt.

*Conclusie:*

De resultaten van dit onderzoek komen overeen met FLETCHER et al. (blz. 115), in die zin dat in de reboundphase een stijging niet alleen van de bezinkingssnelheid en fibrinogeen maar ook van alpha globuline optreedt tot waarden ver boven de uitgangswaarden.

Het gamma globuline stijgt na staken van de behandeling later dan alpha globuline en de bezinkingssnelheid. Daar het gamma globuline bij patient II, ondanks het feit dat het voor de behandeling normaal was, in de loop van de behandeling nog daalt, zouden we de opvatting kunnen steunen dat de gamma globuline-synthese door de corticotrophine- of cortisontherapie primair onderdrukt wordt. Het verloop van het alpha globuline correleert echter zo nauw met de klinische activiteit, althans in die gevallen waar bij de aanvang van de behandeling het alpha globuline verhoogd was, dat het waarschijnlijker is dat deze veranderingen wel een gevolg zijn van de veranderde klinische activiteit van het proces en niet primair op een anti-anabool effect berusten.

FLETCHER et al. (1952) suggereren, eveneens op grond van de goede correlatie, dat ook de veranderingen van het fibrinogeengehalte van het plasma een gevolg zijn van de veranderde klinische activiteit.

Zijn er dus enkele aanwijzingen dat alpha globuline- en fibrinogeenveranderingen geen primaire effecten van de corticotrophinebehandeling zijn, in tegenstelling tot vermindering van de gammaglobuline-concentratie, toch is dit alles zo gecompliceerd, dat men voorzichtig moet zijn op grond van deze waarnemingen en deze curven hiertoe te besluiten.

# X

*a* ELECTROPHORETISCH ONDERZOEK VAN GEWRICHTSVLOEISTOFFEN BIJ RHEUMATISCHE ZIEKTEN.

*b* EIGEN ONDERZOEK.

*c* INVLOED VAN INTRA-ARTICULAIRE TOEDIENING VAN HYDROCORTISON OP DE EIWITFRACTIES VAN DE SYNOVIA-VLOEISTOF.

## *a* ELECTROPHORETISCH ONDERZOEK VAN GEWRICHTSVLOEISTOFFEN BIJ RHEUMATISCHE ZIEKTEN.

*A.* De synovia-vloeistof is een eiwithoudend dialysaat van het bloedplasma, waaraan een eiwit-polysacchariden complex, afgescheiden door de synovia-cellen wordt toegevoegd.
De hoeveelheid vloeistof in het normale kniegewricht van de mens varieert van 0.15–3.5 ml (ROPES en BAUER 1953).
De synovia-vloeistof is aanzienlijk armer aan eiwit dan het plasma.
ROPES en BAUER (1953) onderzochten het totale eiwitgehalte in normale gewrichten van 10 lijders aan decompensatio cordis met sterke oedemen. Het totale eiwitgehalte in deze serie varieerde van 1.07–2.13 gram %.
De eiwitcomponenten van de normale gewrichtsvloeistof blijken qualitatief, van electrophoretisch standpunt bezien, grote overeenkomst te hebben met de plasma-eiwitcomponenten. Een uitzondering hierop is het fibrinogeen, dat in normale gewrichtsvloeistof niet aantoonbaar is.
HESSILVIK (1940) onderzocht het synovia-vocht van vier gevallen van traumatische hydrops. Hij vond hierin als gemiddelde waarden:
Albumine 2.57 gr % (70% van totaal eiwit)
Beta globuline 0.46 gr % (12.5 % van totaal eiwit)
Gamma globuline 0.63 gr % (17.5 % van totaal eiwit)
De snelste component bij electrophorese van het serum is het albumine. Bij electrophorese van synovia-vloeistof echter is de snelste component niet het albumine, maar een polysaccharide en wel het hyaluronzuur (BLIX 1940). Dit hyaluronzuur is bij de gebruikelijke zone-electrophorese met eiwit-kleuring niet aantoonbaar omdat het geen eiwit bevat, maar zuiver hyaluronzuur is. Dit is bij de Tiselius-electrophorese wel als een topje voor het albumine te zien.
Het is te verwachten dat de molecuulgrootte een belangrijke factor is bij de diffusie van de verschillende eiwitfracties door de capillairen en de intercellulaire ruimten van de synovia. Het kleinere albumine molecuul (moleculair gewicht ± 70.000) zal evenals het kleine alpha I en beta globuline molecuul (moleculair gewicht 90.000) gemakkelijker diffunderen dan de grotere globulinemoleculen (moleculair gewicht gamma globuline 150.000, alpha II globuline 300.000, fibrinogeen 400.000, alpha lipoproteine 200.000, beta lipoproteine 1.300.000). Hieruit volgt dat het albumine-globuline quotiënt in de normale gewrichtsvloeistof dan ook veel hoger wordt gevonden dan in het serum (ROPES en BAUER 1953).
De totale hoeveelheid eiwit in pathologische gewrichtsvloeistoffen varieert sterk en is afhankelijk van de aard van de gewrichtsziekte, alsook van de duur en activiteit van het proces. Het varieert van ongeveer 3–6 gr % en is dus duidelijk lager dan in het plasma.
SCHURCH et al. (1950) vonden dat bij de traumatische hydrops het albumine-globuline quotient ongeveer gelijk was als in serum. Bij chronische polyarthritiden kan het albumine-globuline quotiënt van de gewrichtsvloeistof kleiner zijn dan van het serum (PERLMANN en KAUFMANN 1946, SCHURCH et al. 1950, OL-

HAGEN 1951). Deze onderzoekers vonden in enkele chronische gewrichtsexsudaten bij rheumatoide arthritis een hoger relatief gamma globuline in het exsudaat dan in het serum. In absolute waarde uitgedrukt, was het gamma globuline in de gewrichtsvloeistof steeds lager.

PERLMANN en KAUFMANN (1946) suggereren de mogelijkheid van locale vorming van gamma globuline in het gewricht. OLHAGEN (1951) wijdt aan de merkwaardige vondst van een relatief hoger gamma globuline in de gewrichtsvloeistof, een beschouwing. De ziekteduur is van invloed; het gamma globuline is in langdurende exsudaten hoger dan in de kortdurende. Evenals het albumine met het lagere moleculair gewicht gemakkelijker door de synovia penetreert, is het plausibel dat dit kleinere molecuul ook gemakkelijker wordt teruggeresorbeerd. Op grond van het feit dat gamma globuline voor een deel uit antilichamen bestaat is men geneigd een immunologisch proces verantwoordelijk te stellen voor het hoge gamma globuline in de gewrichtsvloeistof.

LEVINTHAL (1938) vond dat streptococcen agglutininen frequenter gevonden worden in gewrichtsexsudaten dan in het serum van lijders aan rheumatoide arthritis. LEVINTHAL interpreteerde deze waarneming alsof er een plaatselijke ophoping van antilichamen zou zijn in het betrokken gewricht, met de mogelijkheid van locale autochthone productie van antilichamen in het rheumatische granuloom. OLHAGEN (1951) voert hier tegen aan, dat hij bij een oud exsudaat van een geval van osteo-arthritis deformans, waar antilichamen nauwelijks verwacht kunnen worden, een zeer hoge relatieve gammaglobuline-concentratie vond.

In de recente literatuur blijft ditzelfde probleem van het relatief hogere gamma globuline nog steeds een onderwerp van bespreking, zonder dat hiervoor een bevredigende oplossing is gevonden. PERLMANN et al. (1954) vonden bij één licht geval van rheumatoide arthritis een normaal gamma globuline in het serum, maar een excessief hoog gamma globuline in de gewrichtsvloeistof (41.2 rel. %). Ook zij denken weer aan locale productie of weefselafbraak als oorzaak.

ROPES en BAUER (1953) delen de resultaten van een zeer uitgebreid onderzoek van de eiwitten van gewrichtsvloeistoffen bij verschillende ziekten mede, echter niet electrophoretisch onderzocht.

In de tabel hiernaast wordt hiervan een overzicht gegeven. Hierin worden de spreiding, de gemiddelde waarde en het aantal onderzoeken opgegeven.

PERLMANN et al. (1954) onderzochten 6 gevallen van traumatische hydrops en vonden dat de relatieve waarden van albumine hoger, van alpha II lager waren dan in het corresponderende serum. De onderzoekers bestudeerden tevens 21 gevallen van rheumatoide arthritis. Zij vonden bij de exsudaten van langere duur dat het relatieve gamma globuline in dezelfde orde van grootte was als het corresponderende serum, terwijl tweemaal het gamma globuline in de gewrichtsvloeistof zelfs veel hoger was (resp. 50% en 170% hoger).

Het totale eiwit was bij de langdurige gevallen ook hoger.

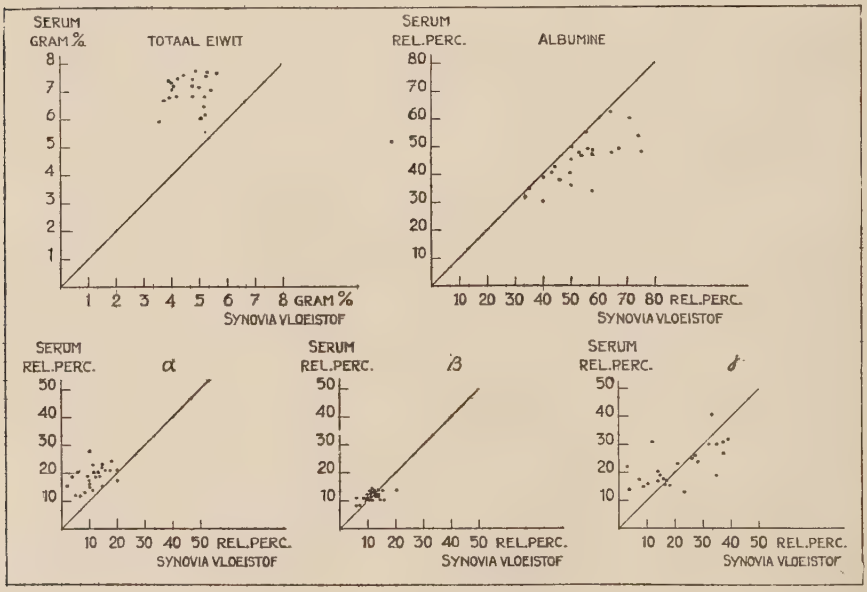
Het alpha I en beta globuline waren steeds nagenoeg gelijk in gewrichtsvloeistof en serum, terwijl het alpha II steeds in de gewrichtsvloeistof duidelijk lager werd gevonden dan in het corresponderende serum.

| | Totaal eiwit gr % | | | Albumine gr % | | | Globuline gr % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | laagste waarde | gemidd. waarde | hoogste waarde | laagste waarde | gemidd. waarde | hoogste waarde | laagste waarde | gemidd. waarde | hoogste waarde |
| | | | (aantal onderz.) | | | (aantal onderz.) | | | (aantal onderz.) |
| *Normaal* | 1.07 | 1.72 | 2.13 (10) | 1.02 | | (1) | 0.05 | | (1) |
| *Traum. arthritis* duur < 3 mnd. | 2.96 | 3.75 | 5.05 (13) | 2.65 | 3.21 | 4.04 (6) | 0.66 | 0.80 | 1.39 (6) |
| duur > 3 mnd. | 3.21 | 4.27 | 5.05 (5) | | 3.29 | (1) | | 1.70 | (1) |
| *Osteo arthrosis deformans* | 1.29 | 3.08 | 4.87 (16) | 1.66 | 2.51 | 3.78 (10) | 0.33 | 0.75 | 1.36 (10) |
| *L.E.D.* | 1.52 | 2.51 | 3.78 (9) | 1.11 | 1.41 | 2.10 (4) | 0.62 | 1.15 | 1.68 (4) |
| *Arthritis urica* | 2.82 | 4.18 | 5.02 (17) | 1.42 | 2.71 | 3.38 (16) | 0.92 | 1.54 | 2.13 (16) |
| *Febris rheumatica* | 1.58 | 3.74 | 4.87 (15) | 1.21 | 2.37 | 3.05 (8) | 0.28 | 1.07 | 1.94 (8) |
| *R.A.* duur < 6 wek. | 3.00 | 4.74 | 6.11 (35) | 2.52 | 3.11 | 3.72 (12) | 1.21 | 1.79 | 3.33 (12) |
| duur 6 wk.–1 jr. | 3.30 | 4.69 | 6.16 (41) | 2.06 | 2.71 | 3.29 (18) | 1.21 | 1.93 | 2.87 (18) |
| duur > 1 jr. | 3.61 | 5.24 | 8.89 (34) | 2.12 | 2.67 | 3.28 (18) | 1.31 | 2.71 | 6.77 (18) |
| *congenit. lues* | 2.95 | 4.67 | 5.77 (11) | 2.24 | 2.67 | 3.32 (9) | 0.71 | 1.77 | 2.53 (9) |
| *Arthritis tubercul.* | 4.05 | 5.31 | 6.06 (10) | 2.78 | 3.31 | 4.27 (6) | 1.19 | 2.00 | 2.75 (6) |

## *b* EIGEN ONDERZOEK VAN DE EIWITVERHOUDINGEN IN DE SYNOVIA-VLOEISTOF.

Door de invoering van de zone-electrophorese is de eiwitanalyse van gewrichtsvloeistoffen zeer vereenvoudigd. Zeer kleine hoeveelheden punctaat zijn voldoende. Is de vloeistof echter zeer visceus dan is het onderzoek niet mogelijk.
Derhalve is het onderzoek van ernstige gevallen gemakkelijker, aangezien hierbij de viscositeit meestal verlaagd is.
De mate van polymerisatie van gewrichtsvloeistof-hyaluronzuur kan worden bepaald door het quotiënt: $\frac{\text{logarithme van de viscositeit}}{\text{hyaluronzuurconcentratie}}$ (RAGAN en MEYER 1949*b*)
In normale gewrichtsvloeistof is dit quotiënt hoger dan 10, terwijl bij rheumatoide arthritis dit lager dan 10 zou zijn.
Opvallend is inderdaad dat bij de langdurige ernstige gevallen, de viscositeit opvallend gering is. Er is een toename van incompleet gepolymeriseerde hyaluronaten, waardoor de viscositeit lager is dan normaal, volgens de opvatting van RAGAN en MEYER. Vooral van chemische zijde zijn tegen deze opvattingen wel bezwaren aangevoerd.

*Onderzoek van de synovia-vloeistof van kniegewrichten bij rheumatoide arthritis. Vergelijking van de electrophoretische eiwitfracties van de synovia-vloeistof met de serumfracties van 25 patienten lijdende aan rheumatoide arthritis.*
De synovia-vloeistof werd opgevangen zonder anticoagulans en derhalve vergeleken met het serum. Hieronder wordt het totale eiwit van het serum vergeleken met het totale eiwit van de gewrichtsvloeistof.



Aangezien bij één patient het kniepunctaat slechts enkele druppels bedroeg kon hiervan het totale eiwit niet bepaald worden. Deze patient vertoonde pas sinds enkele dagen een lichte hydrops van het kniegewricht. Het gamma globuline bleek hier zeer laag te zijn (4%).
Hiernaast worden de relatieve waarden van kniegewrichtsvloeistof en serumeiwitten vergeleken. Hierin werden alpha I en alpha II tezamen genomen als alpha globuline, omdat de scheidingen in de gewrichtsvloeistof-electrophorese enkele keren niet scherp genoeg waren.

*Resultaten.*
Het totale eiwitgehalte van de gewrichtsvloeistoffen bij rheumatoide arthritis varieerde van 3.6 gr % tot en met 5.6 gr % (gemiddelde waarde 4.66 gr %).
Deze gemiddelde waarde komt overeen met de gemiddelde waarde van ROPES en BAUER (blz 127) bij gevallen van rheumatoide arthritis korter dan 1 jaar (zie tabel, totaal 76 gevallen).
In ons onderzoek was het totale eiwitgehalte van de gewrichtsvloeistof 13 maal groter en 11 maal kleiner dan 4.7 gr %.
Van deze 13 gevallen was in 9 gevallen de duur van de hydrops van het onderzochte gewricht langer dan één jaar, terwijl in drie van de 11 gevallen met een totaal eiwit van kleiner dan 4.7 gr %, de hydrops eveneens langer dan één jaar bestond.
We mogen dus zeggen dat in het algemeen de hogere totale eiwitwaarden gevonden werden bij de gevallen van langere duur. Het gemiddelde van deze langer dan één jaar bestaande groep is 4.8 gr % en is dus lager dan in de serie van ROPES en BAUER (blz. 127). De gemiddelde waarde in ons onderzoek van de korter dan één jaar bestaande gevallen van hydrops is 4.5 gr % en verschilt dus maar weinig van de langer bestaande groep.
Het albumine, uitgedrukt in percentage totaal eiwit was in de gewrichtsvloeistof doorgaans hoger, 9 maal gelijk en slechts éénmaal kleiner dan de relatieve albuminewaarde van het serum.
Het alpha globuline was doorgaans lager in de gewrichtsvloeistof uitgezonderd enkele gevallen, waarin het overeenkomst met de waarde in het serum vertoonde. Beta globuline is steeds nagenoeg gelijk aan het serum.
Het gamma globuline werd in de gewrichtsvloeistof 7 maal kleiner dan in het serum, 13 maal gelijk en 5 maal hoger dan in het serum gevonden. In twee van deze 5 gevallen was het gamma globuline van de gewrichtsvloeistof 84 resp. 100 % hoger dan in het serum. Deze waren ook in absolute maat uitgedrukt hoger dan in het serum. Bij deze 5 gevallen waarbij het gamma globuline in de gewrichtsvloeistof hoger was (meer dan 6 relatieve percenten) dan in het corresponderende serum, was de duur van de hydrops van het kniegewricht langer dan één jaar. In de overige van deze langer dan één jaar bestaande groep was 6 maal het relatieve percentage gelijk en éénmaal kleiner dan in het overeenkomstige serum.
Van de korter dan één jaar bestaande groep (13 x) was het relatieve gamma globuline in de gewrichtsvloeistof 7 maal gelijk en zesmaal kleiner dan in het overeenkomstige serum.

Deze onderzoekingen leiden tot het resultaat dat in het algemeen bij de gevallen van rheumatoide arthritis, met een langer dan één jaar bestaande hydrops van het kniegewricht, het gamma globuline evenals het totale eiwit neiging vertoont tot hogere waarden. In beide ziekteduurgroepen kwamen echter, resp. 6 en 7 maal, waarden voor, waarbij het relatieve gamma globuline van serum en gewrichtsvloeistof gelijk is.
Vergelijken we deze resultaten met PERLMANN et al. (1954) dan blijkt dat ook zij bij de langer bestaande exsudaten een toename van relatief gamma globuline vonden.
Het gemiddelde gamma globuline in de korter dan één jaar bestaande groep bedroeg bij hen 17.5 % en in de langer dan 5 jaar bestaande groep 46 %.
In ons onderzoek was het gemiddelde relatieve gamma globuline in de korter dan één jaar bestaande groep (13 gevallen) 14.6 % en in de langer dan één jaar bestaande groep (12 gevallen) 27.3 %. Deze laatste kan dus niet vergeleken worden met de langer dan 5 jaar bestaande groep van PERLMANN.
Opvallend is verder nog dat bij twee patienten waarbij de hydrops nog slechts enkele dagen bestond, een opvallend laag gamma globuline werd gevonden (3.1 en 4 %).
Dat dit bovengenoemd electrophoretisch beeld van de synovia-vloeistof bij rheumatoide arthritis geenszins kenmerkend is voor deze ziekte bewijst het onderzoek van enkele gewrichtsvloeistoffen van patienten die aan andere ziekten lijdende waren gepaard aan arthritis van het kniegewricht, waarbij dezelfde beelden gezien werden.

| | | | $[\alpha_{1+2}]$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Alb. | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| Septische arthritis | serum | 43.7 | 9.5 | 13.– | 19.9 | 13.9 |
| in graviditeit | gewr. vlst. | 46.1 | 9.4 | 10.9 | 23.3 | 10.3 |
| Cong, lues | serum | 47.2 | 5.1 | 19.5 | 11.8 | 16.4 |
| 'Clutton-joints' | gewr. vlst. | 53.3 | 2.6 | 15.4 | 10.9 | 17.8 |
| hydrops inter- | serum | 47.5 | 6.2 | 9.6 | 11.9 | 24.8 |
| mittens genu | gewr. vlst. | 53.8 | 3.3 | | 14.1 | 28.8 |
| gonarthrosis | serum | 60.– | 1.6 | 11.2 | 10.– | 17.2 |
| | gewr. vlst. | 78.– | 3.7 | | 13.7 | 8.3 |
| Ziekte van | serum | 54.6 | 4.9 | 12.8 | 11.6 | 16.1 |
| Bechterew | gewr. vlst. | 67.– | 10.– | | 13.– | 10.– |
| (gonarthritis korter dan 1 jr.) | | | | | | |

Ook bij deze gevallen komt het voor dat het relatieve gamma globuline van de gewrichtsvloeistof gelijk of hoger is dan in het serum.

*Voor de diagnostiek is de electrophorese van de gewrichtsvloeistof zonder betekenis.* Hoe aantrekkelijk het ook zou zijn het al of niet hoger voorkomen van een fractie te verklaren uit de moleculaire grootte van de diverse eiwitfracties, toch zijn hierdoor niet alle bevindingen te verklaren. Toen we in 1952 de beschikking kregen over een sterk locaal werkend steroid, het hydrocortison en daarvan in bijna alle gevallen een evidente klinische verbetering zagen na 24 à 48 uur, tot uiting komende in een afname van de gewrichtszwelling, afname van de huidtemperatuur en verbetering van de functie hebben wij gemeend door de eiwitfracties van de synovia-vloeistof te vervolgen, nader ingelicht te worden over de permeabiliteit van de diverse eiwitfracties. BENNETT en SHAFFER (1939) toonden aan door middel van een praecipitatietechniek dat het kleinere molecuul van het ei-albumine sneller in de synovia-vloeistof van het konijn verscheen na intraveneuze injectie dan de grotere eiwitten van paardenserum; evenzo werd dit kleine ei-albuminemolecuul sneller verwijderd dan de grotere paardenserum-eiwitmoleculen die neiging vertoonden in concentratie toe te nemen.

### *c* DE INVLOED VAN INTRA-ARTICULAIRE TOEDIENING VAN HYDROCORTISON (COMPOUND F) OP DE EIWITFRACTIES VAN DE SYNOVIA-VLOEISTOF.

Nadat de locale werkzaamheid van cortison bij oogaandoeningen was aangetoond (LEOPOLD et al. 1951, STEWART DUKE-ELDER 1951) werd door HOLLANDER et al. (1951) de locale werkzaamheid van hydrocortisonacetaat waargenomen wanneer deze stof intra-articulair werd toegediend. Door de geringe oplosbaarheid van hydrocortisonacetaat bleek deze stof werkzamer te zijn dan cortisonacetaat en hydrocortison als vrije alcohol.
STEVENSON (1951), ZIFF en BUNIM (1952) en BRECK (1952) bevestigden deze resultaten.
In een experimenteel onderzoek vonden GOLDMAN et al. (1952) een remming van de tuberculine reactie door locale injectie van compound *F*.
In de afgelopen jaren werden talrijke publicaties gewijd aan de locale werkzaamheid van hydrocortisonacetaat in de rheumatologie. De meest opvallende verandering van de gewrichtsvloeistof na intra-articulaire toediening van hydrocortison, is de toename van de viscositeit van de gewrichtsvloeistof.
JESSAR, GANZELL en RAGAN (1953) vonden na 21 intra-articulaire hydrocortison-behandelingen 14 maal een toename van de relatieve viscositeit, waarvan 12 maal gepaard aan een toename van het quotiënt van Ragan en Meyer (zie blz. 128) en 13 maal aan een toename van de hyaluronzuurconcentratie.
Terwijl in alle gevallen een subjectieve en objectieve verbetering werd gevonden, vertonen de bovengenoemde veranderingen geen uniform beeld.
Over de werking van hydrocortisonacetaat, intra-articulair toegediend, kunnen we nu de volgende hypothesen opstellen:
*a.* werking op de synoviacellen die hyaluronzuur en andere polysacchariden maken.
*b.* werking op de permeabiliteit van de synovia.
*c.* werking door remming van hyaluronidase.

Aangezien in een gewricht nimmer nog hyaluronidase kon worden aangetoond, is deze laatste veronderstelling over de werking van locaal hydrocortisonacetaat zeer onwaarschijnlijk. Zo blijven de eerstgenoemde twee mogelijkheden over.

*Eigen onderzoek waarbij 17 maal het effect van intra-articulair toegediend hydrocortisonacetaat na éénmalige injectie van 25, 37.5, of 50 mg in kniegewrichten bij lijders aan rheumatoide arthritis werd nagegaan.*

De synovia-vloeistoffen werden voor de toediening en 24, 48 à 72 uur en tot slot 8 à 10 dagen na de toediening onderzocht.

De totale eiwitwaarden daalden na één tot drie dagen in 14 gevallen significant (10 tot 25% afname van de totale eiwitwaarde); 8 à 10 dagen na de intra-articulaire toediening waren in alle gevallen de totale eiwitwaarden weer op de uitgangswaarden teruggekomen. In 3 gevallen bleef het totale eiwitgehalte onveranderd. In deze 14 gevallen waarbij het totale eiwitgehalte (in gr %) enkele dagen na de intra-articulaire injectie duidelijk verminderd was, moet eiwit zijn afgevoerd.

Dat door toename van de hoeveelheid gewrichtsvloeistof deze afname van de eiwitconcentratie optreedt, is niet mogelijk, omdat de gewrichtszwellingen afnamen, het ballottement van de patella verminderde en bij punctie na enkele dagen slechts met moeite enkele druppels gewrichtsvloeistof werden verkregen. Er wordt aangenomen dat de afvoer van de gewrichtseiwitten via de lymphvaten en niet via de bloedcapillairen van de synovia plaats vindt (ROPES EN BAUER 1953).

Zouden nu de kleine eiwitmoleculen gemakkelijker de gewrichtsholte kunnen verlaten, dan zouden we moeten verwachten dat de relatieve concentratie van de grote eiwitmoleculen (alpha II en gamma globuline) zou toenemen.

De onderzoekingen van BENNETT en SHAFFER (1939) suggereren, zoals boven vermeld, een retentie van de grotere eiwitmoleculen.

De electrophoretische eiwitfracties van de synovia-vloeistof werden in deze 17 onderzoekingen bestudeerd. Helaas moesten vele andere onderzoekingen uitvallen omdat de scheidingen bij de zone-electrophorese onvoldoende waren.

Bij deze serie van 17 onderzoekingen waren de scheidingen voldoende; ook alpha I en II waren duidelijk gescheiden.

In alle gevallen werd zorggedragen dat evenveel gewrichtsvloeistof voor onderzoek werd afgenomen, als hydrocortisonsuspensie werd ingespoten. Deze hoeveelheden waren dus 1, $1\frac{1}{2}$ of 2 ml (overeenkomende met resp. 25, 37.5 en 50 mg hydrocortisonacetaatsuspensie).

Nemen we daarentegen alle vloeistof voor de toediening van hydrocortison af dan is de proefopstelling niet geheel zuiver.

Bij twee patienten werd alle gewrichtsvloeistof verwijderd; de kniegewrichten werden zo goed mogelijk leeg gepuncteerd, zonder dat hierna hydrocortisonacetaat werd toegediend. Na 4 dagen was het mogelijk wederom te puncteren omdat de hydrops van de kniegewrichten weer was toegenomen. Het totale eiwitgehalte was in beide gevallen weer significant lager, terwijl bij de één de relatieve verhoudingen van de eiwitfracties onveranderd was gebleven en bij de ander, waarbij de hydrops van het gewricht nog slechts enkele weken bestond, een duidelijke toename

van albumine en lichte afname van gamma globuline en alpha II globuline werd gevonden. Bij deze laatste patient werd dit onderzoek herhaald met dat verschil dat nu na verwijdering van alle vocht wel hydrocortison-acetaat werd ingespoten. Na 7 dagen kon wederom gepuncteerd worden, nadat de knieomvang weer dezelfde toename had bereikt als tevoren zonder hydrocortison na 4 dagen.
De resultaten waren in beide series gelijk.

| | Alb. | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ | Tot. eiwit |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Leeggepuncteerd | 51.2 | 10.– | 9.8 | 14.– | 15.– | 4.80 |
| Na 4 dagen | 60.– | 10.7 | 6.1 | 14.6 | 8.6 | 2.95 |
| Leeggepuncteerd 25 mg hydrocortison ingespoten | 49.8 | 10.5 | 10.5 | 14.3 | 14.9 | 4.77 |
| Na 7 dagen | 59.3 | 10.4 | 7.1 | 13.8 | 9.4 | 3.15 |

Bij de serie van 17 onderzoekingen naar de veranderingen van de gewrichtsvloeistof onder invloed van hydrocortisonacetaat werd dus evenveel vloeistof voor onderzoek afgenomen als hydrocortisonacetaat werd toegediend.

*Resultaten:*
13 maal bleven de relatieve waarden van albumine, alpha I, alpha II, beta en gamma globuline geheel onveranderd, terwijl in deze serie het totale eiwitgehalte in 10 gevallen significant was afgenomen. Driemaal bleef ook het totale eiwitgehalte onveranderd; we mogen dus zeggen dat in 10 gevallen het totale eiwitgehalte afnam maar de relatieve waarden van de diverse fracties onveranderd bleven en dus een deel van iedere fractie even gemakkelijk het gewricht kon verlaten. Driemaal nam de relatieve concentratie van albumine toe met lichte afname van alpha II en gamma globuline en met duidelijke afname van het totale eiwitgehalte. In deze gevallen is echter, voor zover klinisch aantoonbaar, na en door de injectie met hydrocortison het gewricht een korte tijd 'leeg' geweest, zodat deze situatie vergeleken kan worden met bovenbeschreven 'leeg' gepuncteerd gewricht, waarbij hetzelfde werd gevonden zonder hydrocortison.
Eénmaal werd een significante stijging gevonden van het relatieve gamma globuline van 11.– % tot 23.6 %, terwijl het totale eiwit in deze drie dagen gedaald was van 4.49 tot 3.58 gr %. Ook in absolute waarde is het gamma globuline in dit ene geval sterk toegenomen van 0.49 tot 0.84 gr %. ROPES en BAUER (1953) delen mee ook tweemaal gevonden te hebben dat het gamma globuline na intra-articulaire toediening van hydrocortison was toegenomen.
JESSAR, GANZELL en RAGAN (1953) hebben driemaal een zelfde onderzoek verricht en de eiwitveranderingen op dezelfde wijze vervolgd. Zij vonden driemaal geen verandering van de relatieve waarden, zoals door ons tienmaal werd gevonden ondanks de afname van het totale eiwitgehalte.
Concluderend, menen we te mogen zeggen dat bij rheumatoide arthritis de synoviabarrière doorlaatbaar is voor alle serumeiwitten en dat deze barrière qualitatief

voor de afzonderlijke eiwitfracties onder invloed van hydrocortison niet verandert, omdat gebleken is dat grotere of kleinere eiwitmoleculen het gewricht even gemakkelijk verlaten. Wel werd gezien ook zonder hydrocortison dat in een vers geval van een kniehydrops het albumine vlotter de gewrichtsholte bereikte dan het grotere gamma globuline. De sterke toename, ook in absolute waarde, van gamma globuline in één geval blijft onduidelijk, evenals het voorheen genoemde verschijnsel dat in enkele gevallen van langdurige hydrops het relatieve gamma globuline in de gewrichtsvloeistof duidelijk hoger was dan in het serum. Dat hieraan een permeabiliteitsphenomeen ten grondslag zou liggen waarbij de grotere gamma globuline moleculen zouden worden geretineerd is door bovenvermelde onderzoekingen onwaarschijnlijk gemaakt, onder meer omdat dan ook een retentie van het grotere alpha II molecuul zou worden verwacht, wat nimmer werd gevonden. De mogelijkheid van locale productie of weefselafbraak blijft dus bestaan voor de verklaring van het relatief hoge gamma globuline.

De resultaten van BENNETT en SHAFFER (1939) konden door dit onderzoek niet worden bevestigd.

Dat de werking van locaal toegediend hydrocortison zou berusten op verandering van de permeabiliteit van de synovia, is onwaarschijnlijk. Derhalve is het aannemelijker dat het aangrijpingspunt van hydrocortison is gelegen in het synovia-weefsel waarvan de ontsteking tijdelijk gedrukt wordt en de synovia-cellen in staat worden gesteld een normalere gewrichtsvloeistof te produceren, die visceuzer is omdat hoger gepolymeriseerde polysacchariden worden gemaakt.

De studie van deze polysacchariden zal ons mogelijk in de toekomst nader inlichten over de werking van cortison, hydrocortison en corticotrophine op de tussenstof van het bindweefsel.

SAMENVATTING

SUMMARY

LITERATUURLIJST

*1.* De methode van de zone-electrophorese, zoals in dit onderzoek werd uitgevoerd, blijkt te voldoen aan de eisen die het klinisch laboratorium kan stellen. De kleurbaarheid van de verschillende serumeiwitfracties met 'naphthalene-black' *(B.D.H.)* is voor de globuline-fracties minder dan voor albumine, zodat een correctie-factor moet worden toegepast. Op grond van het onderzoek van de kleurstofbinding aan geïsoleerde zuivere serumeiwitfracties, wordt deze factor op 1.6 gesteld.
Aangezien de gemiddelde relatieve waarden van 50 normale personen goede overeenkomst vertonen met de normale waarden opgegeven door andere onderzoekers met andere kleurstoffen (o. a. KUNKEL, TISELIUS 1951; GRASSMANN 1952 en VERSCHURE 1954) kan met deze factor wel genoegen worden genomen, ondanks het feit dat de kleurbaarheid van de afzonderlijke globuline-fracties wel geringe verschillen vertoont. Het is een dringende eis, dat bij deze methode eerst een groot aantal normale personen wordt onderzocht, voordat conclusies mogelijk zijn over sera van patienten.

Uit de gemiddelde waarden van de serumeiwitfracties met hun standaard-deviaties en standaard-fouten werden de te verwachten boven- en ondergrenzen van normalen bij deze methode berekend met een waarschijnlijkheid van $\pm$ 98%. Hiervoor werden de formules toegepast, beschreven door MOORE en LYNN (1941), die veelal bij de electrophorese worden gebruikt. De reproduceerbaarheid van de methode is goed. De gemiddelde fouten met standaard-deviaties van duplo bepalingen werden vastgesteld, ter verkrijging van waarden, waarbuiten met een waarschijnlijkheid van $\pm$ 98%, een nieuwe waarneming significant afwijkend is van een vorige waarneming bij dezelfde patient.
*2.* Dat het albumine-gehalte van het serum, bepaald volgens de uitzoutingsmethode van Howe, te hoge waarden vertoont, is reeds lang bekend. 37 sera werden onderzocht volgens Howe en zone-electrophorese. In alle gevallen was het albumine-percentage volgens Howe duidelijk hoger dan bij zone-electrophorese, vooral bij die gevallen met een verhoogd alpha II globuline (w.o. 'nephrose'-sera). Een vergelijking van deze zone-electrophorese met de Tiselius-methodiek van acht sera was in grote lijnen opvallend goed, uitgezonderd de twee myeloom-sera. Bij deze was zonder gebruik te maken van de factor 1.6, de overeenkomst wel goed. Het beta globuline is bij de zone-electrophorese lager, omdat de lipoiden die hieraan gebonden zijn niet worden meebepaald, in tegenstelling tot de Tiselius-methode waar ze tot verhoging van de brekingsindex-gradient van beta globuline aanleiding geven. Zolang wij het kleurstof-adsorptievermogen van para-proteinen, zoals b.v. bij de ziekte van Kahler, niet kennen, kunnen wij de resultaten van kleurstofbinding van normale eiwitstoffen niet zonder meer transponeren op paraproteinen. Hierdoor wordt het begrijpelijk dat de grootste quantitatieve discrepanties van beide methoden juist worden gevonden bij de ziekte van Kahler. Qualitatief werden echter nimmer belangrijke verschillen tussen beide methoden gevonden.
*3.* In hoofdstuk IV wordt een kort overzicht gegeven, aangevuld met eigen waarnemingen, van de electrophoretische serumeiwitveranderingen bij verschillende

interne ziekten. Het patroon van verhoogd alpha en/of gamma globuline is niet specifiek en kan bij zeer verschillende ziekteprocessen gevonden worden.
Voor de diagnostiek heeft de serumeiwit-electrophorese doorgaans even weinig betekenis als de linksverschuiving in het haemogram.
Een uitzondering hierop is het plasmocytoom of ziekte van Kahler waarbij òf de abnormale plaats van het pathologische eiwit, b.v. tussen twee normale fracties in of het abnormale steile, spitse karakter van de top van diagnostische betekenis kan zijn, evenals bij andere para-proteinaemien. De sterke verhoging van het alpha II globuline bij de lipoid nephrose, het zeer hoge gamma globuline op brede basis bij de levercirrhose kunnen bij deze ziekten een bijdrage tot de diagnose leveren. Natuurlijk zijn er gevallen van deze laatste ziekten, waarbij de veranderingen minder excessief en hierdoor minder karakteristiek zijn.

*Hoofdstuk* V *t/m* X *betreft het speciële gedeelte.*
*Het onderzoek van serum en gewrichtsvloeistof bij collageenziekten.*
*4.* Rheumatoide arthritis.
De totale eiwitwaarden van 50 patienten lijdende aan rheumatoide arthritis vielen alle binnen de normale grenzen.
Bij 75 patienten werden de electrophoretische serumeiwitfracties bepaald. Een globuline-vermeerdering werd in 87,6 % der gevallen gevonden. Het alpha I globuline was in 29%, het alpha II globuline in 60% der gevallen verhoogd. Het gamma globuline was in 48.7% der gevallen verhoogd. In 36% was zowel alpha als gamma globuline verhoogd. Nimmer werd een duidelijke of solitaire verhoging van beta globuline gevonden. In 15% der gevallen werd een globuline-vermeerdering gevonden zonder significante vermeerdering van één van de fracties, die alle nog onder de bovengrens van normaal vielen.
De groep van 75 patienten werd onderverdeeld naar de duur van de ziekte en naar de ernst van het klinisch verloop (volgens criteria van STEINBROCKER).
Het gemiddelde albumine-percentage is in de groep patienten met een ziekteduur van langer dan 5 jaar lager (38.2 rel. %) dan in de 'korter dan één jaar' en '1–5 jaar'-groepen (± 46 rel. %).
Het gamma globuline-gemiddelde neemt toe met de duur van de rheumatoide arthritis in deze drie ziekteduur-groepen (resp. 22.4, 26.2 en 32.6 rel. %). Bij de klinisch ernstig verlopende gevallen in de 'korter dan één jaar'-groep is het alpha globuline-gemiddelde duidelijk verhoogd, terwijl het gamma globuline-gemiddelde slechts licht verhoogd is.
In de '1–5 jaar'-groep is er een duidelijk verschil in gamma globuline-gemiddelde tussen de klinisch licht en zwaar verlopende gevallen (resp. 19.3 en 28.2 rel. %). De klinisch licht verlopende gevallen in de 'langer dan 5 jaar'-groep waren te gering in aantal om hieruit conclusies te trekken in vergelijking met de zware gevallen.
*5.* Er werd geen verband gevonden tussen de Rose-testtiter (gewijzigde Rose-test, van LOGHEM-LANGEREIS 1950) en het gamma globuline relatief percentage bij lijders aan rheumatoide arthritis.
*6.* De veranderingen van de serumeiwitfracties van 22 patienten lijdende aan de

ziekte van Bechterew, komen zowel qualitatief als quantitatief overeen met de bevindingen bij rheumatoide arthritis.
Bij de ziekte van Bechterew is de ziekteduur niet aan te geven daar de ziekte aanvankelijk slechts zeer lichte en vage klachten geeft. De gemiddelde waarden van de gehele groep vallen in dezelfde orde van grootte als de rheumatoide arthritis-groep met een ziekteduur van 1–5 jaar (beide groepen tellen 22 patienten).
Deze overeenkomst der resultaten wijst echter geenszins op een verwantschap tussen beide ziekten!
Een onderverdeling in een groep zonder mede-aandoening van periphere gewrichten (12×) en een groep met mede-aandoening van periphere gewrichten (10×) doet enige verschillen aan het licht komen. De gemiddelden van alpha II en gamma globuline zijn in de laatste groep hoger.
Opvallend is het normale alpha II gemiddelde met kleine standaard-deviatie in de groep zonder periphere arthritiden. Zou hier de ontstekingsfactor gering zijn?
Op grond van onze kennis van de pathologische anatomie (van SWAAY 1950) waarbij geen tekenen van een ontstekingsproces in de wervelkolom werden gevonden, zou dit zeer goed mogelijk zijn. Toch meen ik op grond van de bevindingen in deze kleine groep mij van deze conclusie te moeten onthouden, temeer omdat in de groep van 75 patienten met rheumatoide arthritis ook 7 maal een laag alpha II globuline werd gevonden ondanks ernstig actieve vormen van periphere arthritiden.
*7.* Bij febris rheumatica worden in actieve gevallen vermeerderingen van alpha I en/of II en/of gamma globuline gevonden. Het aantal door mijzelf onderzochte gevallen is beperkt gebleven tot 8, waarvan slechts 3 in klinisch duidelijk actief stadium verkeerden. Statistische bewerking van deze gevallen was dus onmogelijk.
*8.* Bij lupus erythematodes disseminatus wordt door de meeste onderzoekers een hypergammaglobulinaemie waargenomen.
In dit onderzoek werd nagegaan, of de vondst van een normaal of licht verhoogd gamma globuline van het serum de diagnose lupus erythematodes disseminatus zou kunnen uitsluiten.
Aangezien het momenteel nog niet zeker is, of de positieve bevinding van het *L.E.*-celphenomeen ons rechtigt de diagnose op *L.E.D.* te stellen, werd de groep van 24 patienten in 3 groepen onderverdeeld, uitgaande primair van het klinische beeld:
*A.* Typisch klinisch syndroom met positief *L. E.*-celphenomeen (12×)
*B.* Typisch klinisch syndroom met negatieve *L.E.*-celtest. (5×)
*C.* Geen klinisch syndroom; rheumatoide arthritis met positief *L.E.*-celphenomeen (7×).
De gemiddelde waarden van de serumeiwitfracties bij groep *A* verschillen niet met de klinisch ernstige en langer bestaande gevallen van rheumatoide arthritis. De groepen *A*, *B* en *C* tonen grote overeenkomst.
In groep *A* zijn 4 waarnemingen met normaal of slechts licht verhoogd gamma globuline. Het serum-electrophoresepatroon in suspecte gevallen van lupus erythematodes disseminatus biedt geen steun voor de diagnostiek. Een normaal gamma globuline-gehalte sluit de diagnose *L. E. D.* geenszins uit.

*9.* Bij periarteriitis nodosa (4×) werd de globuline-vermeerdering vooral door toename van alpha globuline, bij diffuse sclerodermie (4×) in hoofdzaak door toename van gamma globuline veroorzaakt. In de literatuur staan ons hierover uitvoerigere onderzoekingen ter beschikking.
*10.* De serumeiwit-patronen bij enkele andere gewrichtsziekten vertoonden geen excessieve veranderingen. Een lichte hypalbuminaemie met lichte verhoging van alpha of gamma globuline werd in enkele gevallen waargenomen (arthritis urica, arthritis psoriatica, polyarthritis mutilans, hydrops intermittens genu en polyarthrosis).
Voor de differentiële diagnose tussen polyarthrosis en rheumatoide arthritis is een normaal electrophorese-diagram geen steun in de richting van polyarthrosis! Mutatis mutandis geldt ditzelfde voor hydrops intermittens genu en periarthritis humeroscapularis. Wordt een sterk verhoogd gamma globuline gevonden, dan wordt een polyarthrosis wel onwaarschijnlijk, maar dan zullen de klinische verschijnselen ons meestal niet doen twijfelen aan de juiste diagnose.
*11.* 4 patienten worden vervolgd tijdens behandeling met eenzelfde lage dosis (12 *Ep. d.*) van een zelfde corticotrophine-preparaat, als ook in de 'rebound'-periode na het beëindigen van de therapie.
De verhoogde waarden van alpha en gamma globuline, die voor de behandeling aanwezig waren, daalden tijdens de behandeling tot normale waarden. Bij een patient met normaal gamma globuline werd tijdens de behandeling eveneens een daling van het gamma globuline waargenomen, die echter niet een pathologisch lage waarde bereikte.
Hieruit wordt met enige voorzichtigheid geconcludeerd, dat het gamma globuline tijdens behandeling met corticotrophine door het antianabool-effect van dit hormon daalt, terwijl de daling van alpha globuline meer een afspiegeling is van de verminderde klinische activiteit van het proces.
Na het beëindigen van de behandeling blijft in de rebound-periode het gamma globuline ongeveer 14 dagen op hetzelfde niveau, alvorens weer te stijgen. De uitgangswaarden werden echter na 10 weken niet bereikt. Het alpha globuline en de bezinkingssnelheid stijgen in de rebound-periode tot ver boven de uitgangswaarden. Steeds werd een verband gevonden tussen het alpha globuline en de klinische activiteit van het proces.
*12.* Het electrophoretisch onderzoek van gewrichtsvloeistoffen bij rheumatoide arthritis wordt vergeleken met het serum in 25 gevallen.
Het albumine uitgedrukt in percentage totaal eiwit was in de gewrichtsvloeistof 15 maal hoger, 9 maal gelijk en éénmaal kleiner dan in het serum.
Het alpha globuline was doorgaans in de gewrichtsvloeistof lager dan in het serum, slechts in enkele gevallen gelijk aan het serum, terwijl beta globuline steeds nagenoeg gelijk was met het serum.
In het algemeen werden bij die gevallen van rheumatoide arthritis met een langer dan één jaar bestaande hydrops van het kniegewricht de hogere waarden gevonden van het totale eiwitgehalte en het relatieve gamma globuline. Het gemiddelde relatieve gamma globuline in de korter dan één jaar bestaande hydrops-groep was

14.6 rel. % (13 gevallen) en in de langer dan één jaar bestaande gevallen (12 ×) 27.3 rel. %.
Bij enkele andere gewrichtsaandoeningen met hydrops (septische arthritis, cong. lues, hydrops intermittens genu, gonarthrosis en ziekte van Bechterew) werden soortgelijke synovia-eiwit-patronen gevonden. Ook hier geldt, dat voor de diagnostiek de electrophorese van gewrichtsvloeistof geen betekenis heeft.
Na intra-articulaire injecties met hydrocortison-acetaat bleven in 13 van de 17 onderzoekingen de relatieve waarden van alle fracties onveranderd, ondanks afname van de hydrops en afname van het totaal eiwitgehalte. Driemaal nam de relatieve concentratie van albumine toe met afname van alpha II en gamma globuline en afname van het totale eiwitgehalte. Slechts éénmaal werd ondanks afname van het totale eiwitgehalte in drie dagen een stijging gevonden van het gamma globuline, ook in absolute maat uitgedrukt. ROPES en BAUER (1953) delen mee dit tweemaal gevonden te hebben.
De resultaten van BENNETT en SHAFFER (1939) die wezen op een retentie van de grotere eiwitmoleculen in de gewrichtsvloeistof, konden door dit onderzoek niet worden bevestigd.

*1.* The method of zone-electrophoresis, as it was used in this investigation, was found to meet the requirements of clinical laboratory use. The stainability of the various serum protein fractions with naphthalene black *(B.D.H.)* is less in the globulin fractions than in albumin, so that a correction factor must be applied. On the basis of an investigation into the binding of dye to isolated pure serum protein fractions, this factor was put at 1.6.

Since the average relative values in 50 normal subjects were well in accordance with the normal values reported by other investigators using other dyes (e.g. KUNKEL, TISELIUS, 1951; GRASSMANN, 1952; VERSCHURE, 1954), this factor may be regarded as satisfactory in spite of the slight differences in stainability between the separate globulin fractions. It is of paramount importance, when this method is used, that a considerable number of normal subjects be examined before conclusions are reached regarding patients' sera.

From the average values of the serum protein fractions with their standard deviations and standard errors, the upper and lower normal limits to be expected with this method were calculated to a degree of probability of about 98%. For this purpose, use was made of the formulae described by MOORE and LYNN (1941), which are frequently used in electrophoresis. The reproducibility of the method is satisfactory. The average errors with standard deviations of duplex determinations were established in order to obtain values outside of which, with a probability of about 98%, a new observation is significantly different from a previous observation in the same patient.

*2.* Serum albumin levels determined by HOWE's method have long been known to be too high. Thirty-seven sera were submitted to examination according to HOWE and to zone-electrophoresis. In all cases, the albumin percentage obtained according to HOWE was unmistakably higher than that obtained by zone-electrophoresis, especially in cases showing an increased $\alpha_2$-globulin level (including 'nephrosis' sera). Comparison of the zone electrophoresis findings with those of the TISELIUS method, eight sera showed strikingly good gross correspondence, with the exception of the two myeloma sera. In these, correspondence was good without the aid of factor 1.6. In the case of zone electrophoresis the $\beta$-globulin value is lower because the lipids bound to it are not included in the determination, whereas in the case of the TISELIUS method they give rise to an increase in the refractive index gradient of the $\beta$-globulins.

As long as the dye adsorption ability of paraproteins, e.g. in KAHLER's disease, is unknown, the results of dye binding of normal protein substances cannot be applied to paraproteins without conversion. This explains why it is in KAHLER's disease that the largest quantitative discrepancies of both methods are found. Important qualitative differences, however, have never been found between the two methods.

*3.* Chapter IV gives a brief survey, supplemented by personal observations, of the electrophoretic serum protein changes seen in various internal diseases. The pattern

of an increased $\alpha$-globulin and (or) $\gamma$-globulin level is not specific; it may occur in a variety of pathological processes.

Serum protein electrophoresis is as a rule of as little diagnostic value as the shift to the left in the haemogram, with the exception of plasmocytoma or KAHLER's disease, in which, as in other cases of paraproteinaemia, either the abnormal place of the pathological protein (e.g. inbetween two normal fractions) or the abnormally steep, sharp peak may be of diagnostic significance. The marked increase in the $\alpha_2$-globulin level in lipoid nephrosis, and the very high $\gamma$-globulin level on a broad basis in cirrhosis of the liver, may constitute a diagnostic aid in these affections, although there are of course cases in which the changes are less excessive and therefore less characteristic.

*Chapters* V–X *are concerned with the special aspects.*

*Examination of serum and synovial fluid in collagen diseases.*

*4.* Rheumatoid arthritis.

The total protein values in 50 cases of rheumatoid arthritis were all within normal limits.

Serum protein fractions were determined electrophoretically in 75 cases. A globulin increase was found in 87.6% of cases. The $\alpha_1$-globulin level was increased in 29%, and the $\alpha_2$-globulin level in 60% of cases; 48.7% of cases showed an increase in $\gamma$-globulin. In 36% of cases, both the $\alpha$-globulin and the $\gamma$-globulin level was increased. In no case was an unmistakable or solitary increase in $\beta$-globulins found. In 15% of cases, there was a globulin increase without a significant increase in one of the fractions, which were all below the upper normal limit.

The group of 75 patients was subdivided according to the duration of illness and the severity of the clinical course (according to STEINBROCKER's criteria).

The average albumin percentage in the group with a duration of illness of more than 5 years (38.2 rel. %) was lower than that in the 'less than a year' and '1–5 years' groups (about 46 rel. %).

The $\gamma$-globulin average increased with an increase in duration of the rheumatoid arthritis in these three duration groups (22.4, 26.2 and 32.6 rel. %, respectively). The clinically severe cases in the less than a year group showed a marked increase in $\alpha$-globulin average, while the $\gamma$-globulin average was only slightly increased. There was a marked difference in $\gamma$-globulin average between the clinically mild and the clinically severe cases in the 1–5 years group (19.3 and 28.2 rel. %, respectively). The clinically mild cases in the more than 5 years group were too few in number to warrant conclusions in comparison to the severe cases.

*5.* No correlation was found between the ROSE test titre (VAN LOGHEM-LANGEREIS' 1950 modification of the ROSE test) and the $\gamma$-globulin relative percentage in cases of rheumatoid arthritis.

*6.* The changes in serum protein fractions seen in 22 cases of BECHTEREW's disease (ankylosing spondylitis) corresponded, qualitatively as well as quantitatively, to findings obtained in rheumatoid arthritis.

The duration of illness in cases of BECHTEREW's disease cannot be determined,

as the initial symptoms of the disease are extremely mild and vague. The average values of the entire group were of the same order of magnitude as those of the 1–5 years group of rheumatoid arthritis cases (both groups included 22 patients). This similarity of results certainly does not imply an interrelationship between the two affections!

Subdivision into a group without involvement of peripheral joints (12 cases) and a group with involvement of these joints (10 cases) revealed a few differences. The $\alpha_2$-globulin and $\gamma$-globulin averages in the latter group were higher. A striking feature in the group without peripheral arthritis was found in the normal $\alpha_2$-globulin average with a small standard deviation. Could the inflammatory factor be inconsiderable in this group?

On the basis of the present knowledge of the pathological anatomy (VAN SWAAY, 1950), which reveals no signs of an inflammatory process in the vertebral column, this must be regarded as a possibility. Yet, on the basis of the findings obtained in this small group, I would prefer to refrain from this conclusion, particularly because, in the group of 75 cases of rheumatoid arthritis, there were 7 cases with a low $\alpha_2$-globulin level in spite of severe active forms of peripheral arthritis.

*7.* Active cases of rheumatic fever showed increases in the $\alpha_1$ and (or) $\alpha_2$ and (or) $\gamma$-globulin levels. The number of cases seen by myself remained restricted to 8, of which only 3 were in a clinically unmistakable active stage. Statistical elaboration of findings was therefore impossible.

*8.* The majority of investigators mention an increased $\gamma$-globulin level in lupus erythematodes disseminatus. Investigations were made in order to determine whether the finding of a normal or slightly increased serum $\gamma$-globulin level may exclude the diagnosis lupus erythematodes disseminatus *(L.E.D.)*.

Since it has not yet been established with certainty whether the positive finding of the *L.E.* cell phenomenon warrants the diagnosis *L.E.D.*, the group of 24 patients was subdivided into 3 subgroups, primarily on the basis of the clinical picture:

*A.* Typical clinical syndrome with a positive *L. E.* cell phenomenon (12 cases);

*B.* Typical clinical syndrome with a negative *L.E.* cell test (5 cases);

*C.* No clinical syndrome; rheumatoid arthritis with a positive *L.E.* cell phenomenon (7 cases).

The average values of the serum protein fractions in group A did not differ from the clinically severe, longstanding cases of rheumatoid arthritis. Groups *A*, *B* and *C* showed considerable similarity. Group *A* included 4 observations of a normal or only slightly increased $\gamma$-globulin level.

The serum electrophoresis pattern constitutes no diagnostic aid in suspect cases of *L.E.D.* A normal $\gamma$-globulin level in no way excludes the diagnosis *L.E.D.*

*9.* In periarteritis nodosa (4 cases), the globulin increase was caused mainly by increased $\alpha$-globulin values, while in diffuse scleroderma (4 cases) it was attributable mainly to an increase in $\gamma$-globulin. More comprehensive relevant data from the literature are available to us.

*10.* The serum protein patterns in a few other affections of the joints showed no excessive changes. Some cases showed mild hypalbuminaemia and a slight increase

in $\alpha$-globulin or $\gamma$-globulin values (gout, arthritis psoriatica, polyarthritis mutilans, hydrops intermittens genu and poly-osteoarthritis.)
In the differential diagnosis between osteoarthritis and rheumatoid arthritis, a normal electrophoretic diagram constitutes no argument in favour of osteoarthritis. Mutatis mutandis, the same holds true for hydrops intermittens genu and humero-scapular periarthritis. A marked increase in the $\gamma$-globulin level makes osteoarthritis unlikely; in such cases, however, the clinical manifestations will as a rule leave no doubt as to the correct diagnosis.
*11.* Four patients were followed up throughout a course of treatment with the same small dose (12 *U.* daily) of the same corticotropin preparation, and throughout the rebound period following discontinuation of treatment.
The $\alpha$-globulin and $\gamma$-globulin values – increased prior to treatment – decreased to normal during treatment. One patient with a normal $\gamma$-globulin level also showed a decrease in $\gamma$-globulin during treatment; the level did not, however, reach pathologically low values.
With some reluctance, it is concluded from this observation that the $\gamma$-globulin level decreases during treatment with corticotropin due to the anti-anabolic effect exerted by this hormone, whereas the decrease in $\alpha$-globulin reflects rather the decreased clinical activity of the process.
After discontinuation of treatment, during the rebound period, the $\gamma$-globulin level remained constant for about 14 days, whereupon it increased again. The initial value had still not been reached, however, after 10 weeks. The $\alpha$-globulin level and the *E.S.R.* rose far above initial values in the course of the rebound period. A correlation between the $\alpha$-globulin level and the clinical activity of the process was invariably found.
*12.* In 25 cases the electrophoretic features of the synovial fluid were compared with those of the serum in rheumatoid arthritis. The albumin value, expressed in percentage of total protein, was higher in the synovia than in the serum in 15 cases, equal in 9, and lower than in the serum in one case.
As a rule, the synovial $\alpha$-globulin level was lower than that in the serum; it was equal in only a few cases, whereas $\beta$-globulin values were nearly always equal.
Cases of rheumatoid arthritis with hydrops of the kneejoint of more than a year's standing as a rule showed a higher total protein level and relative $\gamma$-globulin level. The average relative $\gamma$-globulin level in the group with hydrops of less than a year's standing was 14.6 rel. % (13 cases); in the groups with hydrops existing longer it was 27.3 rel. % (12 cases).
Similar synovial protein patterns were found in a few other arthropathies associated with hydrops (septic arthritis, congenital syphilis, intermittent hydrops of the knee, osteoarthritis and ankylosing spondylitis). Again, the synovial electrophoretic pattern is of no value as a diagnostic aid.
In 13 of 17 instances, all fractions remained unaltered following intra-articular injections of hydrocortisone acetate, in spite of reduction of the hydrops and a decrease in total protein level. Three cases showed an increase in relative albumin concentration with a decrease in $\alpha_2$-globulin and $\gamma$-globulin and a decrease in total

protein. Only one case showed an increase, even by absolute standards, in $\gamma$-globulin value within three days, in spite of a decrease in total protein. ROPES and BAUER (1953) reported to have seen this twice.

Findings obtained do not confirm the results of BENNETT and SHAFFER, (1939) which seemed to suggest retention of larger protein molecules in the synovial fluid.

ABERNATHY, R.,
J. Clin. Invest. 30, 626, 1951

ABRAMS, A. en COHEN, P. P.,
J. Biol. Chem. 177, 439, 1949

ADAMS, F. H., KELLEY, V. C., DWAN, F. and GLICK, D.:
Proc. Second. Clin. ACTH Conf. 2, 572, 1951

ALTSHULER, C. H., ANGEVJNE D. M.
Histochemical studies on the pathogenesis of fibrinoid. Am. J. Path. 25, 1061, 1949

ANDERSON, H. C., and MC CARTY, M.:
Am. J. Med. 8, 445, 1950

ANTWEILER, H. J.
Eine Mikroschnellbestimmung der Eiweiszstoffe im Serum. Z. Angew. Chem. 59, 33, 1947

ANTWEILER, H. J.,
Kolloid-Z, 115, 130, 1949

ANTWEILER, H. J.,
Die Quantitative Electrophorese in der Medizin, Springer Verlag, Berlin 1952

ARMAN-CRUZ et al.:
Congr. in Rh. dis. Philadelphia 378 (abstract), 1952

ARMSTRONG, S. H., BUDKA, M. J. E., MORRISON, K. C.
J. Amer. Chem. Soc. 69, 416, 1947

BAEHR, G. en SOFFER, L. J.,
Bull. N. Y. Acad. Med. 26, 229, 1950

BENHAMOU,
Ann. Med. 48, 225, 1947

BENHAMOU en PUGLIESE,
Presse med. 56/58, 689, 1948

BENNETT, G. A., SHAFFER, M. F.,
The passage of proteins from the vascular system into joints and certain other body cavities. J. Exp. Med. 70, 277, 1939

BENNHOLD, H., OTT, H., WIED, M.:
Uber den bindungsunterschied lebergängiger und nierengängiger Substanzen an die Bluteiweiszkörper. Dtsch. med. Wschr. 11, 1950

BERGLUND, K., NORDENSON, N. G. en OLHAGEN, B.,
Acta Endocrinol. V 8, 1–17, 1951

BING, J. B. en PLUM, P.,
Acta Med. Scand. 92, 415, 1937

BING, J., FAGRAEUS, A. en THORELL, B.,
Acta Phys. Scand. 10, 282, 1945

BJORNEBOE, M. en GORMSEN, H.,
Acta Pathol. en Microbiol. Scandin. 20, 649, 1943

BJORNEBOE, M., FISCHEL, E. E., and STOERK, H.,
J. Exper. Med. 93, 37, 1951 (a)

BJORNEBOE, M.
Symposium on the influence of the hypophysis and the adrenal. Zurich 30/9–2/10 blz. 143, 1951 b

BLIX,
Hygiea Stockholm 100, 77, 1939

BLIX, G.
Studies in glyco proteins. Acta Physiol. Scand. I, 29, 1940

BLIX, G., TISELIUS, A., en SVENSSON, H.,
J. Biol. Chem. 137, 485, 1941

BRECK, C. A., BRECK, R. W.
The intraarticular use of Comp. F. Meriden Hosp. Bull. 6, 39, 1952

BROWN, READ, WISEMAN en FRANCE,
J. Labor. & Clin. Med. 33, 1523, 1948

BURNET, F. M. en LUSH, D.,
Aust. J. Exp. Biol. 16, 261, 1938

CANNON, P. R., HEYSTED, D. M. geciteerd door EDSALL, J. T.
Advances Protein Chem. 3, 383, 1947

CARDON, L., ATLAS, D. en GREENEBAUM, R.,
Illinois M. J. 91, 78, 1947

CAREY, R. A., HARVEY, N., HOWARD, J. E.,
Bull. Johns Hopkins Hosp. 87, 425, 1950

CHANUTIN, A., HORTENSTINE, J. C., COLE, W. S. en LUDEWIG, ST.,
J. of Biol. Chem. 123, 246, 1938

CHASE, J. H., WHITE, H. and DOUGHERTY, T., J.
of Immunol 52, 101, 1946

CHASE, M. W.,
Fed. Proc. 10, 404, 1951

CHOW, B. F.,
J. Clin. Invest. 26, 883, 1947

CLUXTON, H. E. JR., KRAUSE, L. A. M.,
Ann. Int. Med. 19. 843, 1943

COBURN, A. F. en MOORE, D. H.,
Bull. of J. Hopkins Hosp. 73, 196, 1943

COHEN en THOMPSON,
J. Labor. & Clin. Med. 32, 314, 1947 a

COHEN en THOMPSON,
J. Labor. & Clin. Med. 32, 475, 1947 b

COHN, E. J.:
Experientia 3, 126, 1947

COHN, E. J.:
Blood 3, 471, 1948
COHN, E. J.,
J. Am. Chem. Soc. 72, 465, 1950
CONN, H. O., KLATSKIN, G.,
Filter Paper Electrophoretic Patterns of Serum in Multiple Myeloma. Am. J. Med. 16, 822, 1954
CONSDEN, R., GORDON, A. H., MARTIN, A. J. P.,
Biochemical Journal 38, 224, 1944
CONSDEN, R.,
in 'Nature and Structure of Collagen', Butterworth's London blz. 196 e.v. 1953a
CONSDEN, R., GLYNN, L. E., STANIER, W. M.,
Biochemical Journal 55, 248, 1953 b
COOLIDGE, T. B.,
J. Biol. Chem. 127, 551, 1939
COOPER, REIN en BEARD,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 61, 179, 1946
CRADDOCK, C. G., LAWRENCE, J. S.,
J. Immunol. 60, 241, 1948
CRAIN, D. D.,
M. Ann. District of Columbia, 19, 293, 1941
CRAMPTON, F. C., HAUROWITZ, F.,
Science 112, 300, 1950
CREDITOR, M. C. e.a.,
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 74, 245, 1950
CREMER, H. D. en TISELIUS, A.,
Biochem. Z. 320, 273, 1950
CURLETTOS, R. en MAGISTRETTI, F.,
Haematologica 33, 529, 1949
DAVIS, J. S.: J. Lab & Clin. Med. 21, 478, 1935—1936
DEUTSCH, ALBERTY en GOSTING,
J. of Biol. Chem. 165, 21, 1946
DEUTSCH, ALBERTY, GOSTING en WILLIAMS,
J. of Immun. 56, 183, 1947
DOLE, V. P.,
J. Clin. Invest. 23, 708, 1944
DOLE, V. P. en EMERSON, JR, K.,
J. Clin. Investigation 24, 644, 1945
DOLE, V. P., WATSON, R. F., ROTHBARD, S., BRAUN, E. and WINFIELD, K.:
J. Clin. Investigation 24, 648, 1945
DOLE, V. P., ROTHBARD, S. and WINFIELD, K.:
J. Clin. Investigation 26, 87, 1947
DONZELOT, KAUFMANN en ESCALLE,
Arch. Mal. Coeur 42, 405, 1949 a
DONZELOT, KAUFMANN en MENDE,
Presse med. 49, 701, 1949 b
DORFMAN, A.:
Ann New York Acad. Sc. 52, 1017, 1098, 1950
DOUGHERTY, T. F., WHITE, A., and CHASE, J. H.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 56, 28, 1944 a
DOUGHERTY, T., CHASE, J. H. en WHITE, A.,
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 57, 295, 1944b
DOUGHERTY, T. F., CHASE, J. H., and WHITE, A.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 58, 135, 1945
DOUGHERTY, T. F.
Symposium on the influence of the hypophysis and the adrenal Zürich 30/9–2/10 1951
DRUKKER, W.,
Vergaderingsverslagen. Afd. Amsterdam, Kon. Ned. Mij. tot Bevordering der Geneeskunst. 17 Febr.–23 Mrt., 54, 1954
DRYER, R. L., BUDDE, J. H., PAUL, W. D. en ROUTH, J. I.,
Federation Proc. 8, 195, 1949
DURRUM, E. L.,
Science 112, 227, 1950
DURRUM, E. L.,
J. Coll. Sci. 6, 274, 1951
EDSALL, J. T.:
Adv. Protein Chem. 3, 383, 1947
EISEN, H. N., MAYER, N. M., MOORE, D. H., TARR, R. R. and STOERK, H. C.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 65, 301, 1947
EHRICH, W. E. en HARRIS, T. N.,
J. Exp. Med, 76, 335, 1942
EHRICH,
Am. Heart J. 43, 142, 1953
ESSER,
Z. kl in. Med. 146, 535, 1950
ESSER, SCHMENGLER,
Sjögrensches Syndrom und reactive Reticulose. Artzl. Forsch. 5, 313, 1951
FAGRAEUS, A.,
Acta Med. Scand. 130, 122, 1948, suppl. 204
FAHRAEUS, R.,
The suspension stability of the blood. Physiol. Rev. 9, 241, 1929
FEARNLEY, G.:

Proc. Second Clin. ACTH Conf. 2, 561, 1951
FERSCHING e a.,
J. Lab. Clin. Med. 36, 820, 1950
FIELD en TEAGUE,
J. Exp. Med., 9, 86, 225, 1907
FINLAND, M.,
Ann. of Int. Med. 33, 1081, 1950
FISCHEL, E. E., LEMAY, M., and KABAT, E. A.,
J. Immunol. 61, 89, 1949
FISCHEL, E. E.,
Bull. N. Y. Acad. Med. 26, 255, 1950
FISCHEL, E. E.,
Cortisone and erythrocyte sedimentation (in Correspondence) J. A. M. A. 146, 1340, 1951
FISHER en DAVIS,
Bull, J. Hopkins Hosp. 71, 364, 1942
FLETCHER, A. A., DAUPHINEE, J. A. and OGRYZLO, M. A.,
Plasma fibrinogen and the sedimentation rate in rheumatoid arthritis and their response to the administration of cortisone and adrenocorticotropic hormone. J. of Clin. Investigation, 31, 6, 561 – 571, 1952
FLYNN, F. V. en DE MAYO, P.:
Lancet 235, 1951 (II)
FORMIJNE, P.,
Persoonlijke mededeling
FORSHAM, P. H., THORN, G. W., PRUNTY, F. T. en HILLS, A. G., J. Clin Endocrinol. 8, 15, 1948
FOSTER, D. P. en WHIPPLE, G. H.,
Am. J. Physiol· 58, 379, 1922
FRANKLIN, POPPER, DE LA HUERGA, BEAN, STEIGMANN, ROTH en BUDDE,
J. Labor. & Clin, Med. 34, 1600, 1949
FRIEDMAN, H. H., SCHWARTZ, S., TRUBEK, M., STEINBROCKER, O.,
The 'Pararheumatic' Arthropathies. Annals of Int. Med. 38, 732, 1953
GERMUTH, F. G. and OTTINGER, B.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 74, 815, 1950
GERMUTH, F. G., and OTTINGER, B.,
J. Exp. Med. 94, 139, 1951
GJESSING, E. C. en CHANUTIN, A.,
J. of Biol. Chem. 165, 413 en 421, 1946
GJESSING, E. C. en CHANUTIN, A.,
J. of Biol. Chem. 159, 657, 1947 *a*
GJESSING, E. C., LUDEWIG, S. en CHANUTIN, A.,
J. Biol. Chem.170, 551, 1947 *b*
GILLARD, P.:
Contribution a l'etude de l'Haptoglobine. Thesis Paris 1947
GOLDMAN, L., PRESTON, R. H., ROCKWELL, E., BASKETT, J.,
Inhibitions of tuberculin reactions by local injection of compound F. J. A. M. A. 150, 30, 1952
GOLDSTEIN, A.,
J. of Pharmacol. 95, 102, 1949
GOOD, R. A., and CAMPBELL, B.:
Am. J. Med. 9, 330, 1950
GORNALL, A. G.,
Journ. of Biological Chemistry 177, 751, 1949
GOSLINGS, J., QUERIDO, A., CATS, A., en KASSENAAR, A.
Evaluation of Corticotrophine (A. C. T. H.) in Patients.
Acta Medica Scandinavica 148, 343, 1954 *a*
GOSLINGS, J.,
Inaugurele rede, Leiden 22 Oct. 1954b
GRASSMANN, W. en HANNIG, K.,
Naturwiss. 37, 397 en 496, 1950
GRASSMANN, W., HANNIG, K., en KNEDEL, M.,
Deutsche med. Wochenschr. 76, 333, 1951
GRASSMANN, W., en HANNIG, K.:
Verfahren zur Analyse der Serum protein, Hoppe-Seyler 's Zeitschrift fur Physiol, Chemie 290, 1, 1952
GRAY, S. J., and MITCHELL, E. B.,
Effect of purified protein fractions on the sedimentation rate of erythrocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 51, 403, 1942
GRAY en BARRON,
J. Clin. Invest. 22, 191, 1943
HAHN, E. O., HOISER, H. B., RAMMELKAMP, C. H., JR., DENNY, F. W. WANNAMAKER, L. W.,
J. Clin. Invest. 30, 274, 1951
HAKANSON, E. Y., and LUFT, R. :
Acta Endocrinol. 3, 318, 1949
HAM, T. H., and CURTIS, F. C.,
Plasma fibrinogen response in man. Influence of the nutritionale state, induced hyperpyrexia, infectious disease and liver damage. Medicine, 17, 413, 1938 *a*
HAM, T. H. and CURTIS, F. C.,
Sedimentation rate of erythrocytes: in-

fluence of technical, erythrocyte and plasma factors and quantitative comparison of five commonly used sedimentation methods. Medicine, 17, 447, 1938*b*

HAMMOND, C. W., NOVAK, M.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 74, 155, 1950

HARDWICKE, J., SQUIRE, J. R.,
Basis of the Erythrocyte Sedimentation Rate. Clinical Science 11, 333, 1952

HARGRAVES, M. M., RICHMOND, H., MORTON, R.,
Presentation of two bone marrow elements: the 'tart' cell and the 'L. E.' cell. Proc. Staff Meet., Mayo Clin., 23, 25–28, 1948

HARRIS, T. N., GRIMM, E. G., MERTENS, E. en EHRICH, W. E.,
J. Exp. Med. 81, 73, 1945

HARRIS, T. N., RHOADS, J., STOKES, J.,
J. Immunol. 58, 27, 1948

HARRIS, S., HARRIS, T. N. en FARBER, M. B.,
J. Immunol. 72, 148, 161, 1954

HARTMANN,
Z. klin. Med. 147, 375, 1950 *a*

HARTMANN en STEINEBACH,
Dtsch. Arch. klin. Med. 197, 568, 1950 *b*

HASERICK, J. R., SUNDBERG, R. D.,
The bone marrow as a diagnostic aid in acute disseminated lupus erythematosus. J. Invest. Dermat. 11, 209–213, 1948

HASERICK, J. R., LEWIS, L. A.,
Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus. II. Induction of specific antibodies against L. E. factor. Blood, 5, 718–722, 1950 *b*

HASERICK, J. R., LEWIS, L. A., BORTZ, D. H.
Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus. I. Determination of gamma globulin as specific plasma fraction. Am. J. M. Sc. 219, 660–663, 1950 *a*

HASERICK, J. R.,
J. A. M. A. 146, 16, 1951 *a*

HASERICK, J. R.:
Proc. Second Clin. ACTH Conf. 2, 685, 1951 *b*

HEDLUND, P.:
Das Auftreten von akutem Phasenprotein bei verschiedenen Krankheiten. Acta Med. Scand. (Stockh.) Suppl. Bd. 196 579, 1947

HEILMEYER en BEGEMANN,
Med. Mschr. 4, 260, 1950

HEKTOEN, L., and CURTIS, A. R.,
J. Infect. Dis., 17, 409, 1915

HENCH, P. S., KENDALL, E. C., SLOCUMB, C. H., POLLEY, H. F.
The effect of a Hormone of the Adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydro-corticosterone: compound E) and of the pituitary adrenocorticotropic hormone on Rheumatoid Arthritis. Preliminary report. Proc. Staff Meet., Mayo Clin. 24, 181, 1949

HENRIQUES, C. B., HENRIQUES, S. B. en SELYE, H.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 73, 611, 1950

HERBERT, P. H. and DE VRIES, J. A.,
Endocrinogy, 44, 259, 1949

HESS, E. L., COBURE, ROSENBERG,
J. Lab. and Clin. Med. 38, 521, 1951

HESSELVIK, L.
An electrophoretic investigation on syno vial fluid. Acta Med. Scandinav. 105, 153, 1940

HEYDEMANN, S. F. B.,
Academisch Proefschrift Amsterdam 1953

HEYDEMANN, S. F. B.,
Ned. Tijd. v. Geneesk. 98, 3174, 1954

HOLLANDER, J. L., BROWN, E. M., JESSAR, R. A., BROWN, C.
Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints J. A. M. A. 147, 1629, 1951

HOLMBERG, C. G., LAURELL, C. B.:
Studien uber die Eisenbindungsfähigkeit des serums: Mitteilung neuer Kenntnisse über den Regulationsmechanismus des Serumeisens. Acta Physiol. scand. 10, 307, 1945

HOWE, P. E.
The use of sodium sulphate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood.
J. Biol. Chem. 49, 93, 1921

INDERBITZIN, TH.
Das Lupus erythematodes-Zell-Phänomen. Röntgen und Laboratoriums Praxis, 7, 189, 1954

JAFFE, H. L., MARINE, D.,
J. Infect. Dis. 35, 334, 1924

JAGER, V. B., SMITH, E. L., NICKERSON, M., BROWN, D. M.:
J. of Biol. Chem. 176, 1177, 1948

JANSSEN, L. W. en GORMSEN, H.,
Electrophoretic studies in serum proteins. blz. 71 1951 N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij

JANSSEN, L. W., van ROYEN, A. H. H.:
The alpha-2-globulin of pathological sera. Electrophoretic studies on serum proteins. Kon. Ned. Ak. Wet. 1951

JANSSEN, L. W.
Electrophoretic studies on serum protein. N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Mij. Amsterdam 1951

JAQUELINE et al,
Revue Rheum. 1951, blz. 527

JESSAR, R. A., GANZELL, M. A., RAGAN, Ch.
The action of hydrocortisone in synovial inflammation. J. Clin. Invest. 32, 480, 1953

JONES, H. B., GOFMAN, J. W., LINDGREN, F. T., LYON, T. P., GRAHAM, D. M., STRISOWER, B., NICHOLS, A. V.
Lipoproteins in atherosclerosis. Amer. J. of Med. 11, 358, 1951

JÜRGENS, R., GEBHARDT, F.
Arch. Exper. Path. u. Pharmakol. 175, 558, 1934

KABAT, HANGER, MOORE en LANDOW,
J. Clin. Invest 22, 563, 1943

KAGAN, B. M.:
Am. J. M. Sc. 206, 309, 1943

KAPOSI, M. K.,
Arch. Dermat. u. Syph. 4, 36, 1872

KASS, E. H. e. a.,
Ann. Intern. Med. 33, 1081, 1950

KEEFER, C. S., FELTY, A. R.,
Bull. Johns Hopkins Hosp. 35, 294, 1924

KEKWICK, R. A.
Observations on the crystallizable albumin fraction of horse serum. Biochem. J. 32, 552, 1938

KEKWICK,
Biochemic. J. 34, 1248, 1940

KEKWICK, R. A.:
Med. Bull. 5, 1204, 1948

KELLGREN, J. H., BALL, J., ASTBURY, W. F., REED, R., BEIGHTON, E.
Nature 168, 493, 1951

KELLGREN, J. H.
VIIIe Congres Internat. des Mal. Rhum., Genève, I Rapports blz. 21 e. v. 1953

KENDALL, JETTE en WEST,
J. Amer. Chem. Soc., 48, 3114, 1926

KENDALL,
Amer. J. Med. 2, 386, 1947

KEUNING, F. J en VAN DER SLIKKE, L. B.,
J. Lab. & Clin. Med. 36, 167, 1950

KHORAZO, D.,
J. Immunol., 21, 151, 1931

KINNEY, T. D., and MAHER, M. M.:
Am. J. Path. 16, 561, 1940

KLEMPERER, P., POLLACK, A. D., BAEHR, G.
Diffuse collagen disease; acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma. J. A. M. A. 119, 331, 1942

KLINGE, F.
Die Eiweissüberempindlichkeit (Gewebsanaphylaxie) der Gelenke. Experimentelle pathologisch-anatomische Studie zur Pathogenese des Gelenkrheumatismus. Beitr. z. path. Anat. u. z. Allg. Path. 83, 186, 1929

KLINGE, F.
Der Rheumatismus. Ergebn. d. allg. Path. u. path. Anat. 27, 1, 1933

KOLOUCK, F.,
Proc. Soc. 39, 147, 1938

KUIPERS, R. K. W., DE BLÉCOURT, J. J. en GOSLINGS, J.,
Aanwinsten op diagnostisch en therapeutisch gebied, III Rheuma, Elsevier publishing company, 1954, blz. 167

KUKOWKA, A.,
mededeling op het 8e internationale congres van rheumatische ziekten (Genève 1953)

KUNKEL, H. G. en TISELIUS, A.,
J. Gen. Physiol. 35, 89, 1951

KUNKEL, H. G., SLATER, R. J.
Lipoprotein patterns of serum obtained by zone electrophoresis. J. Clin. Invest. 31, 679, 1952

KÖRVER, geciteerd in R. EMMRICH:
Das Bluteiweissbild, Ferd. Enke Verlag Stuttgart blz. 25, 1952

LAMY, M., LAMOTTE, M. en LAMOTTE-BARILLON, S.,
'La denutrition. Clinique, biologie, therapeutique' G. Dion, Paris 1948

LARSON, D. L. en TOMLINSON, L. J.,
J. Clin. Invest. 30, 1451, 1951

LAYANI, F., BENGUI, A. en DE MENDE, S.,
Semaine des Hospitaux 80, 3221, 1952

LEE, S. L., MICHAEL, S. R., VURAL, I. L.
The lupus erythematosus. cell. Am J. Med. 10, 446–451, 1951

LEIBETSEDER, HUGENTOBLER, WUN-

DERLY, en WUHRMANN,
Wien. Z. inn. Med. 32, 1, 1951
LEINBROCK, A.
Dysproteinaemiën bei Dermatosen.
Hautarzt 3, 9, 1952
LEINWAND, I.,
J. Lab. & Clin. Med. 37, 532, 1 51
LEOPOLD, I. H., PURNELL, J. E., CANNON E. J., STIENMETZ, C. G., MC. DONALD, P. R.
Am. J. Ophth. 34, 361, 1951
LEPOW, H., BUBENSTEIN, L., WELL, F., and GREISMAN, H.:
Am. J. Med. 7, 310, 1949
LERNER, GREENBERG:
J. of Biol. Chem. 162, 429, 1946
LERNER WATSON
Am. J. Med. Sci. 214, 410, 1947
LEVER, W. F., SCHULTZ, E. L., HURLEY, M. A.
Plasma protein in various diseases of the skin; electrophoretic studies. Arch. Dermat. & Syph. 63, 702, 1951
LEVINTHAL, W.:
Proc. Int. Congr. Rheumat. Hydrol. Bath. 1938, p. 345.
LEWIS en MC CULLAGH,
J. Clin. Endocrinol. 7, 559, 1947
LÖFSTRÖM, G.,
Nord. Med. 2: 1927, 1939
LÖFSTRÖM, G.,
Act. Med. Scand. 110, 41, 1942
LÖFSTRÖM, G.,
Nonspecific capsular swelling substance in Pneumococci. Thesis Stockholm 1943
LÖFSTRÖM, G.,
Brit. J. Exper. Path. 25, 21, 1944
LOGHEM-LANGEREIS, E. P., VAN
Serologische reacties bij rheumatische ziekten. Academisch proefschrift, Amsterdam 1950
LONGWORTH, L. G., SHEDLOVSKY, T. en MC INNES, D. A.,
J. Exper. Med. 70, 399, 1939
LONGWORTH en MC INNES,
J. of Exper. Med. 71, 77, 1940
LÖVGREN, O.
Studien über den intermediären Stoffwechsel bei chemischer Polyarthritis. Acta Medica Scandinavica Suppl. 122, 163, 1945
LUETSCHER, J. A.:
Amer. Chem. Soc. 61, 2888, 1939
LUETSCHER, J. A.:
J. Clin. Investigation 19, 313, 1940
LUETSCHER, J. A.:
J. Clin. Invest. 20, 99, 1941
LUETSCHER, J. A.,
Physiol. Rev. 27, 621, 1947
LYMAN DUFF, G.,
The collagen diseases: The musculoskeletal system, p. 243. The Macmillan company, New York 1952
MADDEN, WHIPPLE,
Physiol. Rev. 20, 194, 1940
MAJOOR, C. L. H.,
Acad. proefschr. Amsterdam 1942
MAJOOR, C. L. H.,
J. biol. Chem. 169, 583, 1947
MAJOOR, C. L. H., HEYDEMANN, S. F. B.,
Ned. Tijd. v. Geneesk. 98, 3177, 1954
MALMROS, H., BLIX, G.:
Acta Med. Scandinav., Suppl. 170, 284, 1946
MARIE, P., LERI, A.,
Bull. et mém. Soc. Med. hôp. Paris 36. 104, 1913
MARMONT, A.,
Arch. Path. Clin. Med. 3, 1289, 1948
MARSHALL, A. H. E. en WHITE, R. G.,
Brit. J. Exp. Path. 31, 157, 1950
MARTIN, A. J. P., SYNGE, R. L. M.,
Biochemical Journal 35, 1358, 1941
MARTIN,
Brit. J. Exper. Path. 27, 363, 1946
MARTIN,
Brit. J. Exper. Path. 30, 231, 1949
MASSELL, B. F., MOTE, J. R., and JONES, T. D.:
J. Clin., Investigation 16, 125, 1937
MC CARTY, M.:
J. Exper. Med. 85, 491, 1947
MC CLEAN, D.,:
J. Path. & Bact. 54, 284, 1942
MC CULLAGH, LEWIS en OWEN,
10, 88, 1943
MC CULLAGH en LEWIS,
J. Amer. Med. Assoc. 124, 801, 1944
MC CULLAGH en LEWIS,
Amer. J. Med· Sci. 210, 81, 1945
MC MASTER, P. D. en HUDACK, S. S.,
J. Exp. Med. 61, 783, 1935
MESTER, A.,
Ztschr. F. Rheuma Forsch. 1, 554, 1938
MILLER, L. L., BLY, C. G., WATSON, M. L., BALE, W. F.
The dominant role of the lever in plasma protein synthesis. Journal of Exp. Med.

94, 431, 1951
MILNE, J. en WHITE, A.,
Proc. Soc. Exper. Biol. (N. Y.) 72, 424, 1949
MIRICK, G. S.,
J. Clin. Invest. 29, 839, 1950
MIRICK, G. S.,
Bull. Johns Hopkins Hosp. 88, 332, 1951
MITCHELL, R. F.:
Biochimica et biophysica Acta. 9, 4, 1952
MOESCHLIN, S. en PELAEZ,
Acta Haematologica 6, 321, 1951
MOESCHLIN, S. en DEMIRAL,
Klin. Wochenschrift 30, 827, 1952
MOORE, H. D., LYNN, J.
J. of Biol. Chem. 141, 819, 1941
MOORE, D. H., MARTIN DU PAN, C. L. BUXTON,
Amer. J. Obstetr. 57, 312, 1949
MOYER, J. B., FISHER, G. S.,
Experimental production of '*L. E.*' cells.
Am. J. Clin. Path., 20, 1011–1015, 1950
MURPHY, J. B., STURM, E.,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 66, 303, 1947
NELSON, L. S.,
J. Bone & Joint Surg. 20, 1045, 1938
NERNST, W.,
Z. Elektrochem. 3, 308, 1897
NEUBERGER, A., PERRONE, J. C., SLACK, H. G. B.
Biochemical Journal 49, 199, 1951
NEUBERGER, A., SLACK, H.G. B.
Biochemical Journal 53, 47, 1953
NEUBERGER, A.
Geciteerd naar een mededeling over een studiereis van Dr. P. H. Mars, gehouden voor de Amsterdamse Chemische Vereniging, 29-10-1954
NEUMANN, E.
Die Picrocarminfärbung und ihre Anwendung auf die Entzündungslehre.
Arch. f. mikr. Anat. 18, 130, 1880
NEWELL, J. M., STERLING, A., OXMAN, M. F., BURDEN, S. S. en KREJCI, L. E.
J. Allergy 10, 513, 1939
NIELSEN, B., SNORRASON, E.,
Acta Radiol. 27, 607, 1946
OGRYZLO, M. A.:
Proc. Second Clin. ACTH Conf. 2, 565, 1951
OAKLEY, C. L., WARRACK, G. H. en BATTY, D.,
J. Path. Bact. 61, 179, 1949
O'LEARY, P. A. and WAISMAN, M.:
Arch. Dermat. & Syph. 41, 1001, 1940
OLHAGEN, B.,
Meeting of the Svedish Soc. Intern Medic. May 1944 (discussion)
OLHAGEN, B.,
Acta Med. Scand. (Stockholm) suppl. 196, 478, 1947 *a*
OLHAGEN, B.,
Nord. Med. 34, 992, 1947 *b*
OLHAGEN, B.,
(Discussion) Nord. Med. 43, 798, 1950
OLHAGEN, B.
The protein patterns of joint exsudates.
Acta Orthop. Scandinav. 20, 114, 1951
OLHAGEN, B.,
Congres on Rh. Dis. Philadelphia W. B. Saunders Comp. 365, 1952
ONCLEY, J. L., GURD, F. R. N., MELIN, M.,
J. Amer. Chem. Soc. 72, 458, 1950
OSGOOD, Ch. K. en FAVOUR, C. B.,
J. Exp. Med. 94, 415, 1951
OSLER, W.,
Am. Jour. Med. Sci., 110, 629, 1895
OTT, H., HUBER, H., KÖRVER, G.
Ein vergleich der Electrophoresenmethoden nach Tiselius, Antweiler und Turba.
Kl. Wochnschr. 30, 34, 1952
OVERMAN, J. R. en HANAN, R.,
Proc. Soc. Exp. Biol. 82, 427, 1953
PAUL, GORDON, DRYER en ROUTH,
Fed. Proc. 8, 235, 1949
PAUL, W. D. en ROUTH, J. I.
Electr. Analyses of plasma and serum protein in R. A. en Rh. spond. Feder. Proc. 9, 213, 1950
PEDERSEN, K. O.:
Untersuchungen mit der Ultracentrifuge an Serum und Serumfraktionen. Upsala 1945
PEDERSEN, K. O., WALDENSTRÖM, J.:
4th internat. Congress microbiol. Copenhagen 1947
PERLA, D., GOTTESMAN, J. M.,
J. Exper. Med. 47, 723, 1928
PERLMANN, E., BULLOWA, J. G. M., and GOODKIND, R.:
J. Exper. Med. 77, 97, 1943
PERLMANN, G. E. en KAUFMAN, D.:
J. Clin. Invest. 25, 931 (Abstract), 1946
PERLMANN, G. E., ROPES, M. W., KAUFMAN, D., BAUER, W.
The electrophoretic patterns of protein

in synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 33, 319, 1954

PETERMANN, KARNOFSKY en HOGNESS, Cancer 1, 109, 1948

POLONOVSKI, N., JAYLE, M. F.: Bull. Soc. Chim. Biol. 21, 48, 1939

POPPER, BEAN, DE LA HUERGA, Gastroenterol. Baltimore 17, 138, 1951

PORTER, K. R. Transact. 2nd Conf. Conn. Tiss. Josiah Macy Jr. Foundation 126–158, 1951

RAFFSKY, WEINGARTEN, KREIGER, STERN en NEWMAN, Gastroenterol Baltimore 14, 29, 1950

RAGAN, C., GROKOEST, A. W. en BOOTS, R. H., Am. J. Med. 7, 741, 1949 *a*

RAGAN, CH., MEYER, K. Journ. of Clin. Invest. 28, 56, 1949 *b*

RANTZ, L. A., RANDALL, E. and RANTZ, H. H.: Am. J. Med. 5, 3, 1948

REINER, M., Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 74, 529, 1950

RICKETTS en STERLING, J. Clin. Invest. 28, 1477, 1949 *a*

RICKETTS, STERLING, KIRSNER en PALMER, Gastroenterol. Baltimore 13, 205, 1949 *b*

RICKETTS, KIRSNER, PALMER en STERLING, J. Labor. & Clin. Med. 35, 403, 1950

RIVA, G. en MARTINI, V.: Erfahrungen mit der Papierelectrophorese, Schweiz, Med. Wschr. 83, 5, 1953

ROBINSON, W. D., DUFF, I. F., BLOCK, W. D. en FOSTER, P. W. Electr. of plasma protein in R. A. Ann. Rh. Dis. 9, 383, 1950

ROEGHOLT, L. P., VAN GOOL, J. Een geval van periarteriitis nodosa met cryoglobulinaemie. Mededeling vergadering Nederlandse Internisten Vereniging Rotterdam 27-11-1954. Wordt gepubliceerd in Ned. Tijdschr. v. Geneesk.

ROHN, R. J., BOND, W. H. Some supravital observations on the *L. E.* phenomenon. Am. J. Med. 12, 422-432, 1952

ROPES, M. W., Proc. First Clin. A. C. T. H. Conf., J. R. Mote ,Philadelphia, The Blakeston Comp. 345-347, 1950

ROPES, M. W., BAUER, W. Synovial fluid changes in joint disease. Cambridge Mass. Harvard Univ. Press 1953

ROPES, M. W., PERLMNAN, G. E., KAUFMAN, D., BAUER, W. The electrophoretic distribution of protein in plasma in rheumatoid arthritis J. Clin. Invest., 33, 311, 1954

ROSE, RAGAN, PEARCE en LIPMAN, Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 68, 1, 1948

ROSENGREN, E., Nord. Med. 43, 681, 1950

ROTHBARD, S., WATSON, R. F., SWIFT, H. F. and WILSON, A. T.: Arch. Int. Med. 82, 229, 1948

ROTTINO, SUCHOFF en STERN, J. Labor. & Clin. Med. 33, 624, 1948

ROYEN, A. H. H., VAN: Haptoglobin, bijdrage tot de kennis der alphaglobulinen. Thesis Amsterdam 1950

ROYEN, A. H. H., VAN: zie Janssen en van Royen 1951

ROUTH, J. I. en PAUL, W. D.: Electr. Analyses of plasma and serum protein in R. A., Arch. Phys. Med. 31, 511, 1950

RUSS, E. M., EDER, H. A., BARR, D. P.: Am. J. of Med. 11, 468, 1951

RUTSTEIN, D. D., CLARKE, F. H. and TARAN, L. M.: Science 101, 669, 1945

SABIN, F. R. Studies of living human blood-cells Bull. Johns Hopkins Hospital, 34, 277-288, 1923

SABIN, F. R., J. Exp. Med. 70, 67, 1939

SAUNDERS, R. H., JR., and ADAMS, E., Blood, 5, 732, 1950

SAYERS, G., BURNS, T. W., TYLER, F. H., JAGER, B. V., SCHWARTS, T. B., SMITH, E. L., SAMUELS, L. T. and DAVENPORT, H. W., J. Clin. Endocrinol. 9, 593, 1949

SCHAAP, G. J. P., Ned. Tijdschrift v. Geneesk. 41, 2549, 1952

SCHADE, A. L., CAROLINE, L.: Science 104, 340, 1946

SCHMITT, F. O

Geciteerd naar een mededeling over een studiereis van Dr. P. H. Mars, gehouden voor de Amsterdamse Chemische Vereniging, 29-10-1954

SCHOENHEIMER, R., RATNER, S., RITTENBERG, D., HEIDELBERGER, M.,
J. of Biol. Chem. 144, 545, 1942

SCHUIT, R.,
*L. E.* cel en *L. E.* phenomeen, Tijdschr. Med. Analysten 9, 106-108, 1952

SCHURCH, O., VIOLLIER, G., SÜLLMANN, H.
Elektrophoretische Untersuchung von Kniegelenk ergüssen. Schweiz. Med. Wchnschr. 80, 711, 1950

SCULL, C. W., BACH, T. F. and PEMBERTON, R.,
Ann. Int. Med., 12, 1463, 1939

SEIBERT en NELSON,
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 49, 77, 1942

SEIBERT, NELSON:
Amer. Rev. Tbc. 47, 66, 1943

SEIBERT, F. B., SEIBERT, M. V., ATNO, A. J., CAMPBELL, H. W.:
J. Clin. Investigation 26, 90, 1947

SELYE, H.:
Stress, Montreal, 1950. Acta, Inc.

SHEDLOWSKY, T., SCUDDER, J.
A comparison of *E. S. R.* and electrophoretic patterns of nomal and pathological-human blood. J. Exper. Med. 75, 119, 1942

SMADEL, J. E., WOODWARD, T. E.
Ann. Intern. Med. 34, 1 en 10, 1951

SMITH, K. and FABER, V.:
Acta Endocrinol. 3, 310, 1949

SMYTH, C. J.
Bone absorption in rheumatoid arthritis. Rheumatic diseases W. B. Saunders Company. Philadelphia-London 1952

SOFFER, L. J., LEVITT, M. F. en BAEHR, G.
Arch. Int. Med. 86, 558, 1950

SOFFER, L. J., BAEHR, G., LEVITT, M. F. and BADER, M.:
Proc. Second. Clin. ACTH Conf. 2, 680, 1951

SOLOMON, S., KASICH, M. and KIVEN, N.:
Ann. Int. Med. 21, 638, 1944

STAUB,
Helvet. med. Acta 14, 334, 1947

STEINBROCKER, D., TRAEGER, C. H., BATTERMAN, R. C.
Journ. Am. Med. Association 140, 659, 1949

STENHAGEN, E.
Electrophoresis of human blood plasma. Electrophoretic properties of fibrinogen Biochemical Journal 32, 714, 1938

STERLING, K. J.,
J. Clin. Invest. 28, 1052, 1949

STERN, K. G. en REINER, M.,
Yale J. Biol. and Med. 19, 67, 1946

STEVENSON,
Annals of Rheum. Diseases 10, 473, 1951

STEWART DUKE-ELDER, ASHTON, N.
Action of *E* on tissue reactions of inflammations and repair with special reference to the eye. Br. J. Ophth. 35, 695, 1951

STOLLERMAN, G. H. e. a.,
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 76, 261, 1951

STURSBERG, H.,
Deutsch. Med. Wochnschr. 61, 5, 1935

SURGENOR, D. M., KOECHLIN, L. E., STRONG, L. E.:
J. Clin. Invest. 27, 344, 1948

SVARTZ, N.,
Nord. Med. 18, 673, 1943

SVARTZ, N.,
Nord. med. 23, 1713, 1944

SVARTZ, N. en OLHAGEN, B.
Acta Med. Scand. 130 suppl 206, 456, 1948

SVEDBERG, Th. PEDERSEN, K. O.:
The ultracentrifuge, Oxford 1940

SVEDIN, B. en BENGTSSON, G.,
Acta Med. Scand. 119, 426, 1944

SVENSSON, H.
J. Biol. Chem. 139, 805, 1941

SWAAY, H., VAN
Spondylosis ankylopoetica. Academisch proefschrift, Leiden 1950

TAKÉ, N. M., MARINE, D.
The effect of suprarenalectomie in rabbits on hemolysin formation. J. Infect. Dis. 33, 217, 1923

TALIAFERRO, W. H. en TALIAFERRO, L. G.,
Federat. Proc. 8, 412, 1949

TARVER, H., REINHARDT, W. D.
Journal of Biol. Chem. 167, 395, 1947

TAUSSIG, A. E.:
J. Lab. & Clin. Med. 23, 833, 1938

TAYLOR, H. L., MICKELSEN, O. en KEYS, A.,
J. Clin. Investigation 28, 273, 1949

TEILUM, G.
Pathogenetic studies on lupus erythematosus disseminatus and related diseases. Acta med. Scandinav. 123, 126, 1946
THATCHER, J. S., HOUGHTON, B. C., and ZIEGLER, C. H.,
Endocrinology, 43, 440, 1948
THORELL, B. en WISING, P.,
Nord. Med. 24, 1842, 1944
THORN, ARMSTRONG en DAVENPORT,
J. Clin. Invest. 24, 802, 1945
THORN, ARMSTRONG en DAVENPORT,
J. Clin. Invest. 25, 304, 1946
TISELIUS, A.
Electrophoresis of serum Globulin. Biochem. J. 31, 313, 1937 b
TISELIUS, A.:
Trans. Faraday Soc. 33, 524, 1937a
TISELIUS, A. en KABAT, E. A.,
J. Exp. Med. 69, 119, 1939
TISELIUS, A.,
Congress Faraday Soc. 1952
TURBA, F., ENENKEL, A. J.
Elektrophorese von Proteinen in Filterpapier. Naturwiss. 37, 93, 1950
VARS, H. M.,
Am. J. Physiol. 93, 554, 1930
VAUGHAN, J. H., BAYLES, T. B., FAVOUR, C. B.
The effect of *ACTH* on blood complement, gamma globulins and fibrinogen. J. Clin. Invest. 29, 850, 1950
VAUGHAN, J. H.,
J. Lab. Clin. Med. 37, 698, 1951
VAUGHAN, J. H., BAYLES, T. B., FAVOUR, C. B.
Effect of 17 hydroxy-11-dehydro corticosterone and adrenocorticotropic hormone upon plasma gamma globulin, fibrinogen and erythrocyte sedimentation rate. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 76, 274, 1951
VERSCHURE, J. C. M. en BOOM, J. A.
De algemene cilinische toepasbaarheid van de papier-electrophorese. Ned. Tijdschr. Geneesk. 98, III, 37, 2607, 1954
VIGLIANI, BOSELLI en MAFFEZOLI,
Arch. Mal. Prof. 2, 559, 1950 *a*
VIGLIANI, BOSELLI en PECHIAL,
Medicin. Lav. 41, 33, 1950 *b*
VOLLMER, E. P. en SAMSELL, E.,
Endocrinology, 45, 204, 1949
VOLLMER, E. P. en HURLBUT, H. S.,
J. Infect. Dis. 89, 103, 1951
VRIES, J. A., DE
J. Immunol., 65, 1, 1950
WALDENSTRÖM, J.:
Beginnende Myelomatose oder essentielle Hyperglobulinaemie mit Fibrinogenopenie – Ein neues Syndrom? Acta Med. Scand. 117, 216, 1944
WALDENSTRÖM, J.:
Zwei interessante Syndrome mit Hyperglobulineamie (Purpura hyperglobulinämica und Makroglobulinämie). Schweiz. Med. Wschr. 78, 927, 1948
WALDENSTRÖM, J.:
La Presse Medicale vol. 57, 213, 1949
WALKER, S. A., BENDITT, E. P.
An electrophoretic study of the serum protein in scleroderma. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 67, 504, 1948 ,
WALKER, S. A. and BENDITT, E. P.:
J. Invest. Dermat. 14, 113, 1950
WALLIS, A. D.:
Am. J. M. Sc. 212: 713, 716, 718, 1946; 213: 87, 94, 1947
WALLIS, A. D.:
The serum protein in R. A. Annals of Int. Med. 32, 63, 1950
WEICKER,
Arztl. Wschr. 5, 923, 1950
WEIGELDT, W.,
München. med. Wochenschr. 76, 1270, 1929
WHIPPLE, G. H.
Am. J. Physiol. 33, 50, 1941
WHIPPLE, MADDEN,
Medicine 23, 215, 1944
WHITE, A. en DOUGHERTY, T. F.,
Endocrinol. 36, 207, 1945
WHITMAN, ROSSMILLER en LEWIS,
J. Labor. & Clin. Med. 35, 167, 1950
WIEDEMANN,
Schweiz. Med. Wschr. 75, 229, 1945
WIEDEMANN,
Schweiz. Med. Wschr. 76, 241, 1946
WIELAND, TH. en FISCHER, E.,
Naturwiss. 35, 29, 1948
WRIGHT, S.:
Applied physiology, Oxford University Press, 1947
WU, H.
Journ. of Biol. Chem. 51, 33, 1922
WUHRMANN, F., WUNDERLY, CH.
Schweiz. med. Wschr. 76, 251, 1946
WUHRMANN,
Schweiz. Z. Path. (Suppl.) 10, 202, 1947 *a*

WUHRMANN, F. und WUNDERLY Ch.: Die Bluteiweisskörper des Menschen. Basel: Benno Schwabe 1947 *b*

WUHRMANN, F., Verh. dtsch. path. Ges. 32, 5, 1949 *a*

WUHRMANN, F., Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 55, 284, 1949 *b*

WUHRMANN, F., WUNDERLY, CH. en HUGENTOBLER, F., Deutsch. Medizin. Wsch: 74, 481, 1949 *c*

WUHRMANN, WUNDERLY, DE NICOLA en HUGENTOBLER, Helvet. Med. Acta 17, 197, 1950

WUHRMANN, Schweiz. Med. Wschr. 82, 5, 1952

WUNDERLY, CH., WUHRMANN, F. Oncologia (Basel) 1, 73, 1948

ZELDIS, ALLING, MC COORD, KULKA, J. of Exper. Med. 82, 411, 1945

ZIFF, M., BUNIM, J. J., Ann. Rheum. Dis. 11, 301, 1952

ZIMMER, FR. E., HARGRAVES, M. M. H., The effect of blood coagulation on *L.E.* cell formation. Proc. Staff Meetings Mayo Clinics 27, 424, 1952

AMSTERDAM, KONINGSLAAN 18

DRUK HOOIBERG, EPE